

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO**

**FACULTADE DE FARMACIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA



**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS  
COMPUESTOS BASADOS EN EL ANILLO DE INDANO**

Memoria que para optar al grado de

Doctora en Farmacia presenta

Nerea Alonso Sousa

Santiago de Compostela



# **SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS COMPUESTOS BASADOS EN EL ANILLO DE INDANO**

Memoria para optar al grado de Doctora en Farmacia

Nerea Alonso Sousa





D. XERARDO GARCÍA MERA, Profesor Titular de Química Orgánica, D. FRANCO FERNÁNDEZ GONZÁLEZ, Catedrático de Química Orgánica y Dña. MARÍA OLGA CAAMAÑO SANTOS, Profesora Titular de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada *SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS COMPUESTOS BASADOS EN EL ANILLO DE INDANO*, que para optar al Grado de Doctora en Farmacia presenta NEREA ALONSO SOUSA, ha sido realizada bajo nuestra dirección conjunta en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y considerando que el trabajo realizado constituye tema y labor de Tesis Doctoral, autorizamos su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que conste, expedimos la presente certificación en Santiago de Compostela, marzo de dos mil doce.

Fdo.: Xerardo García Mera

Fdo.: Franco Fernández González

Fdo.: María Olga Caamaño Santos



## ***AGRADECIMIENTOS***



*Y es que no hay nada mejor que imaginar, la física es un placer  
es que no hay nada mejor que formular, escuchar y oír a la vez...*



A D. Franco Fernández González por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por guiarme a lo largo de estos años. A D. Xerardo García Mera por la impecable dirección de este trabajo y por su apoyo y confianza durante esta etapa. A Dña. Maria Olga Caamaño Santos por sus consejos, por el ánimo prestado y sobre todo por su amabilidad y disponibilidad.

A Mari Carmen, José Manuel y Borges por prestarme su ayuda y ofrecerme su apoyo en todo momento, y en general por estar siempre que lo he necesitado.

A mis compañeros de laboratorio por todo lo vivido dentro y fuera de él. A Melvin por su compañía y paciencia, y por todo lo que me ha enseñado en los primeros años tanto a nivel científico como personal. A Marta, Anxo, Helena y Sara por las pequeñas pero tan importantes aportaciones realizadas a este trabajo. A los doctores Marcos e Isa por haber estado ahí y porque seguro que de alguna manera habéis participado y me habéis ayudado a desarrollar este trabajo. A Joana por ser no solo mi compañera sino mi amiga especialmente en esta última etapa y por todos los buenos momentos vividos juntas.

A Xosé y Daniel por el apoyo técnico y por resolver todas mis dudas y problemas de manera impecable.

A todos los miembros de los grupos de investigación de los profesores Eugenio Uriarte, Eddy Sotelo y Enrique Raviña, especialmente a María Torrado por ser la primera persona en mostrarme la realidad de este mundo.

A D. Stefano Moro e tutti i membri della Molecular Modelling Section della Università degli Studi di Padova, grazie mille per tutto, siete bravissimi.

A los integrantes de los servicios de RMN, Rayos X y Masas por los análisis aquí descritos y por su eficaz trabajo.

A Paula porque comenzamos siendo compañeras de laboratorio pero ahora formas parte de mi vida y estarás ahí para siempre, sin duda descubrimos el cierzo y espero que todavía nos queden muchas cosas más por descubrir juntas, y *que pueda contar contigo como sabes que conmigo siempre. Que no cuente la suerte, no, solo el destino que nos presentó.*

A Pili, porque aunque los inicios no fueron muy prometedores sin duda el final ha merecido la pena, por ayudarme y escucharme y porque te has sabido ganar un rinconcito.

A Silvia, porque sin importar los años que pasen y las cosas que nos sucedan siempre estas ahí, a pesar de los problemas logísticos de comunicación tarde o temprano siempre conseguimos comunicarnos (ahí lo dejo).

A Pri, porque el final de esta etapa no sería igual sin ti, gracias por nuestras infinitas charlas en el San Clemente (de hecho creo que también debería darle las gracias a los camareros...), aunque no hayamos cumplido mucho nuestro propósito inicial, el aporte personal que me has proporcionado lo compensa todo.

Sin importar donde estéis o si en algún momento llegareis a leer esta dedicatoria quiero dar las gracias a todas la personas que me habéis acompañado en mi aventura por tierras italianas porque a pesar de haber sido un período muy corto muchos formáis ya parte de mí. Gracias Felix, Ali, Marta y Héctor, sólo me queda deciros *che sarà, che sarà, che sarà, che sarà della mia vita, chi lo sà...* (me parecía poco apropiada el tractor amarillo).

A mis amigas de siempre, Ma, Mon, Noe y Xo porque da igual donde vivamos y que hagamos con nuestra vida que siempre seguiremos estando para lo que necesitemos y sobre todo para ser grandes amigas, y *para que siempre podamos conocidos encontrarnos, alargarnos la sonrisa, sacudirnos la distancia y poder burlar al tiempo, para que la luna llena nunca choque contra el suelo.*

A Carla y Joao por darme el mejor regalo de tesis, dentro de unos años podremos decirte que tú estuviste ahí, escuchando como la tía se hacía doctora.

A mis padres, por todo el esfuerzo, el apoyo y la confianza depositada en mí, este trabajo es tan mío como vuestro, y a todas las Balbinas del mundo.

A Javi, por ser, por estar, por escucharme, por apoyarme, por ayudarme, por quererme... es imposible decir todo lo que siento y todo por lo que estoy agradecida, y *yo no lo sabía, quien me lo iba a decir que solo con tu sonreír inundarías todo mi ser de alegría, que yo no lo sabía que me podría encontrar algo tan dulce como tú, eres lo más bonito que he visto en mi vida.*

*Mil gracias siempre...*



Parte del trabajo recogido en esta memoria ha sido objeto de publicación:

Nerea Alonso, Olga Caamaño, Franco Fernández, Xerardo García-Mera, Melvin Morales, José Enrique Rodríguez-Borges, and Eric De Clercq. "Synthesis and Antiviral Activities of Novel Purinyl-and Pyrimidinyl-carbanucleosides Derived from Indan". *Synthesis* **2008**, 1845.

Humberto González-Díaz, Francisco Prado-Prado, Xerardo García-Mera, Nerea Alonso, Paula Abeijón, Olga Caamaño, Matilde Yáñez, Cristian R. Munteanu, Alejandro Pazos, María Auxiliadora Dea-Ayuela, María Teresa Gómez Muñoz, M. Magdalena Garijo, José Sansano, and Florencio M. Ubeira. MIND-BEST: Web Server for Drugs and Target Discovery; Design, Synthesis, and Assay of MAO-B Inhibitors and Theoretical-Experimental Study of G3PDH Protein from *Trichomonas gallinae*". *Journal of Proteome Research* **2011**, *10*, 1698.

Francisco Prado-Prado, Xerardo García-Mera, Manuel Escobar, Nerea Alonso, Olga Caamaño, Matilde Yáñez, and Humberto González-Díaz. "3D MI-DRAGON: new model for reconstruction of US FDA drug-target network and theoretic-experimental studies of rasagiline derivatives inhibitors for AChE". *European Journal Medicinal Chemistry*, sometido



## ***I. ÍNDICE***



<b>I. ÍNDICE</b> .....	I
<b>II. RELACIÓN DE ABREVIATURAS</b> .....	IX
<b>III. RELACIÓN DE COMPUESTOS DESCRITOS</b> .....	XIX
<b>IV. SUMMARY</b> .....	XXVII
 <b>CAPÍTULO 1: SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS CARBANUCLEÓSIDOS PORTADORES DE BASES PÚRICAS O PIRIMIDÍNICAS BASADOS EN EL ANILLO DE INDANO</b> .....	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>1.1. EL ANILLO DE INDANO</b> .....	5
<b>1.2. ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS</b> .....	7
<b>1.2.1. Aspectos generales</b> .....	7
<b>1.2.2. Análogos de nucleósidos como antivirales</b> .....	9
<b>1.2.3. Análogos de nucleósidos como anticancerígenos</b> .....	15
<b>1.3. CARBANUCLEÓSIDOS</b> .....	18
<b>1.3.1. Origen y desarrollo</b> .....	18
<b>1.4. METODOLOGÍA SINTÉTICA PARA EL DESARROLLO DE CARBANUCLEÓSIDOS</b> .....	25
<b>1.4.1. Planteamiento general</b> .....	25
<b>1.4.2. Introducción directa del sistema heterocíclico</b> .....	26
<b>1.4.3. Construcción de la base heterocíclica natural o modificada</b> .....	29
<i>1.4.3.1. Síntesis de cicloalquilaminas funcionalizadas</i> .....	29
<i>1.4.3.2. Construcción de la base heterocíclica</i> .....	32
<b>2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3. QUÍMICA: PARTE TEÓRICA Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	41
<b>3.1. PLANTEAMIENTO SINTÉTICO</b> .....	43
<b>3.1.1. Síntesis de dioles</b> .....	45
<i>3.1.1.1. Reducción de cetoésteres con borhidruro de litio. Obtención de la mezcla de dioles 55a y 55b</i> .....	45
<b>3.1.2. Reacciones de protección de alcoholes: sililación y acetilación</b> .....	47
<i>3.1.2.1. Obtención de (±)-cis-3-(tert-butildimetilsililoxi)metilindanol (59)</i> .....	47
<i>3.1.2.2. Obtención de acetato de (±)-trans-3-hidroxi-1-indanilmetilo (66)</i> .....	48
<b>3.1.3. Sustitución directa de un grupo hidroxilo: reacción de Mitsunobu</b> .....	48
<i>3.1.3.1. Obtención del benzoato (±)-trans-3-(tert-butildimetil- sililoxi)-1-indanilo (60)</i> .....	48

<b>3.1.4. Síntesis de derivados púricos.....</b>	<b>49</b>
3.1.4.1. <i>Reacción de Sustitución Nucleófila Aromática. Síntesis de derivados</i>	
6-oxo, 6-cicloalquilamino y 6-metoxipurinilcarbanucleósidos.....	50
3.1.4.2. <i>Reacción de Suzuki-Miyaura. Formación de derivados 6-arilpurínicos .....</i>	<b>52</b>
<b>3.1.5. Síntesis de derivados pirimidínicos.....</b>	<b>56</b>
3.1.5.1. <i>Síntesis y reducción de oximas. Obtención del clorhidrato de</i>	
(±)-cis-3-amino-1-indanocarboxilato de metilo (75) .....	58
3.1.5.2. <i>Construcción del anillo pirimidínico. Obtención de (±)-cis-1-(3-</i>	
<i>hidroximetil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (80) .....</i>	59
3.1.5.3. <i>Obtención de 5-halopirimidinilcarbanucleósidos 81, 82 y 83 .....</i>	60
<b>4. QUÍMICA: PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1. ASPECTOS GENERALES .....</b>	<b>65</b>
<b>4.2. 3-Oxo-1-indanocarboxilato de metilo (58) .....</b>	<b>68</b>
<b>4.3. (±)-cis- y (±)-trans-3-Hidroximetil-1-indanol (55a y 55b) .....</b>	<b>74</b>
<b>4.4. (±)-cis-3-(tert-Butildimetilsililoxi)metilindanol (59) .....</b>	<b>80</b>
<b>4.5. Benzoato de (±)-trans-3-[(tert-butildimetilsililoxi)metil]-1-indanilo (60).....</b>	<b>83</b>
<b>4.6. (±)-trans-3-[(tert-Butildimetilsililoxi)metil]-1-indanol (61) .....</b>	<b>86</b>
<b>4.7. (±)-cis-3-(6-Cloro-9H-purin-9-il)-1-[(tert-butildimetilsililoxi)metil]indano (62) .....</b>	<b>89</b>
<b>4.8. (±)-cis-3-(6-Hidroxi-9H-purin-9-il)-1-indanilmetanol (63) .....</b>	<b>92</b>
<b>4.9. (±)-cis-3-(6-N-Ciclopropilamino-9H-purin-9-il)-1-[(tert-butildimetilsililoxi)-</b>	
<b>metil]indano (64) .....</b>	<b>95</b>
<b>4.10. (±)-cis-3-(6-N-Ciclopropilamino-9H-purin-9-il)-1-indanilmetanol (65) .....</b>	<b>98</b>
<b>4.11. Acetato de (±)-trans-3-hidroxi-1-indanilmetilo (66) .....</b>	<b>102</b>
<b>4.12. Acetato de (±)-cis-3-(6-cloro-9H-purin-9-il)-1-indanilmetilo (67).....</b>	<b>105</b>
<b>4.13. (±)-cis-3-(6-Cloro-9H-purin-9-il)-1-indanilmetanol (68).....</b>	<b>108</b>
<b>4.14. Acetato de (±)-cis-3-(6-fenil-9H-purin-9-il)-1-indanilmetilo (69).....</b>	<b>111</b>
<b>4.15. Acetato de (±)-cis-3-[6-(4'-clorofenil)-9H-purin-9-il]-1-indanilmetilo (70) .....</b>	<b>114</b>
<b>4.16. (±)-cis-3-(6-Metoxi-9H-purin-9-il)-1-indanilmetanol (71) .....</b>	<b>117</b>
<b>4.17. (±)-cis-3-(6-Fenil-9H-purin-9-il)-1-indanilmetanol (72).....</b>	<b>120</b>
<b>4.18. (±)-cis-3-[6-(4'-Clorofenil)-9H-purin-9-il]-1-indanilmetanol (73).....</b>	<b>123</b>
<b>4.19. syn y anti-(3-Hidroxiimino)-1-indanocarboxilato de metilo (74).....</b>	<b>127</b>
<b>4.20. Clorhidrato de (±)-cis-3-amino-1-indanocarboxilato de metilo (75).....</b>	<b>130</b>
<b>4.21. Isocianato de 3-etoxiacrilóilo (76) .....</b>	<b>133</b>
<b>4.22. (±)-cis-N-(3-Metoxicarbonil-1-indanil)-N'-(3-etoxipropenoil)urea (77) .....</b>	<b>134</b>

4.23. (±)- <i>cis</i> -1-(3-Hidroxicarbonil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (78) .....	137
4.24. (±)- <i>cis</i> -1-(3-Metoxycarbonil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (79) .....	140
4.25. (±)- <i>cis</i> -1-(3-Hidroximetil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (80) .....	143
4.26. (±)- <i>cis</i> -5-Cloro-1-(3-hidroximetil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (81) .....	146
4.27. (±)- <i>cis</i> -5-Bromo-1-(3-hidroximetil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (82) .....	149
4.28. (±)- <i>cis</i> -5-Yodo-1-(3-hidroximetil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (83) .....	152
5. ENSAYOS BIOLÓGICOS .....	155
6. CONCLUSIONES .....	167
 <b>CAPÍTULO 2: DESARROLLO DE NUEVOS NEUROPROTECTORES</b>	
<b>DERIVADOS DEL INDANO COMO NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA</b>	
<b>PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS .....</b>	<b>171</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>173</b>
<b>1.1. LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS .....</b>	<b>175</b>
1.1.1. Aspectos generales.....	175
1.1.2. Neurotransmisores .....	176
1.1.2.1. Acetilcolina .....	176
1.1.2.2. Dopamina .....	178
1.1.2.3. Glutamato.....	180
<b>1.2. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON .....</b>	<b>182</b>
1.2.1. Tratamiento .....	183
1.2.2. Levodopa.....	183
1.2.3. Amantadina .....	184
1.2.4. Agonistas dopaminérgicos .....	184
1.2.5. Inhibidores de la MAO-B .....	185
1.2.5.1. Introducción .....	185
1.2.5.2. Selegilina.....	188
1.2.5.3. Rasagilina .....	188
1.2.5.4. Unión de la rasagilina al enzima .....	191
<b>1.3. FÁRMACOS DE ACCIÓN DUAL.....</b>	<b>194</b>

<b>1.4. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....</b>	<b>195</b>
<b>1.4.1. Hipótesis colinérgica .....</b>	<b>196</b>
1.4.1.1. <i>Inhibidores de la acetilcolinesterasa .....</i>	<i>197</i>
1.4.1.2. <i>Memantina.....</i>	<i>198</i>
<b>1.4.2. Hipótesis amiloide .....</b>	<b>199</b>
<b>1.4.3. Hipótesis metabólica .....</b>	<b>199</b>
<b>1.5. LADOSTIGILO .....</b>	<b>200</b>
<b>2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS .....</b>	<b>203</b>
<b>3. QUÍMICA: PARTE TEÓRICA Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>211</b>
<b>3.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE RASAGILINA SUSTITUIDOS EN LA</b>	
<b>POSICIÓN 3 (IX) .....</b>	<b>213</b>
<b>3.1.1. Síntesis de aminoalcoholes precursores 84a y 84b .....</b>	<b>213</b>
3.1.1.1. <i>Acilación de Friedel-Crafts.....</i>	<i>214</i>
3.1.1.2. <i>Reducción directa de oxoamidas.....</i>	<i>219</i>
<b>3.1.2. Alquilación de aminas. Propargilación de los aminoalcoholes 84a/84b .....</b>	<b>223</b>
<b>3.1.3. Acetilación y benzoilación de los derivados 92a y 92b .....</b>	<b>226</b>
<b>3.1.4. Síntesis de derivados de 3-amino-1-indanona 97 y 98.....</b>	<b>228</b>
<b>3.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE RASAGILINA SUSTITUIDOS EN LA</b>	
<b>POSICIÓN 2 (X y XI) .....</b>	<b>230</b>
<b>3.3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE LADOSTIGILO QUE PRESENTAN EL</b>	
<b>GRUPO CARBAMATO EN EL ANILLO DE CICLOPLENTANO DEL INDANO ..</b>	<b>233</b>
<b>4. QUÍMICA: PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>237</b>
<b>4.1. Ácido (±)-3-amino-3-fenilpropanoico (86).....</b>	<b>240</b>
<b>4.2. Ácido (±)-3-fenil-3-(2,2,2-trifluoroacetamido)propanoico (87) .....</b>	<b>243</b>
<b>4.3. Cloruro de (±)-3-fenil-3-(2,2,2-trifluoroacetamido)propanoilo (88) .....</b>	<b>246</b>
<b>4.4. (±)-2,2,2-Trifluoro-N-(3-oxo-1H-1indanil)acetamida (89) .....</b>	<b>249</b>
<b>4.5. (±)-cis- y (±)-trans-2,2,2-Trifluoro-N-(3-hidroxi-1-indanil)acetamida (90a y 90b) .</b>	<b>252</b>
<b>4.6. (±)-cis- y (±)-trans-3-Amino-1-indanol (84a/84b).....</b>	<b>258</b>
<b>4.7. (±)-cis- y (±)-trans-3-(N-Propargilamino)-1-indanol (91a y 91b)</b>	
<b>(±)-cis- y (±)-trans-3-(N,N-Dipropargilamino)-1-indanol (92a y 92b) .....</b>	<b>262</b>
<b>4.8. Acetato de (±)-cis-(N,N-dipropargilamino)-1-indanilo (93a).....</b>	<b>274</b>
<b>4.9. Acetato de (±)-trans-(N,N-dipropargilamino)-1-indanilo (93b) .....</b>	<b>277</b>
<b>4.10. Benzoato de (±)-cis-(N,N-dipropargilamino)-1-indanilo (94a) .....</b>	<b>281</b>
<b>4.11. Benzoato de (±)-trans-(N,N-dipropargilamino)-1-indanilo (94b).....</b>	<b>283</b>



4.12. Clorhidrato de (±)-3-amino-1 <i>H</i> -indan-1-ona (95) .....	287
4.13. (±)-3-Amino-1 <i>H</i> -indan-1-ona (96) .....	290
4.14. (±)-3-( <i>N</i> -Propargilamino)-1-indanona (97) y (±)-3-( <i>N,N</i> -Dipropargilamino)- 1-indanona (98) .....	293
4.15. (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> )-(+)- <i>cis</i> -1-( <i>N</i> -propargilamino)-2-indanol (100) y (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> )-(+)- <i>cis</i> -1- ( <i>N,N</i> -Dipropargilamino)-2-indanol (101) .....	300
4.16. Acetato de (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> )-(-)- <i>cis</i> -1-( <i>N,N</i> -dipropargilamino)-2-indanilo (102) .....	306
4.17. Benzoato de (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> )-(-)- <i>cis</i> -1-( <i>N,N</i> -dipropargilamino)-2-indanilo (103) .....	309
4.18. (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> )-(-)- <i>cis</i> -1-( <i>N</i> -Propargilamino)-2-indanol (105) y (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> )-(-)- <i>cis</i> -1- ( <i>N,N</i> -Dipropargilamino)-2-indanol (106) .....	313
4.19. Acetato de (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> )-(+)- <i>cis</i> -1-( <i>N,N</i> -dipropargilamino)-2-indanilo (107) .....	319
4.20. Benzoato de (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> )-(+)- <i>cis</i> -1-( <i>N,N</i> -dipropargilamino)-2-indanilo (108) .....	322
4.21. Dietilcarbamato de (±)- <i>cis</i> -3-( <i>N,N</i> -dipropargilamino)-1-indanilo (109a) .....	326
4.22. Dietilcarbamato de (±)- <i>trans</i> -3-( <i>N,N</i> -dipropargilamino)-1-indanilo (109b) .....	329
4.23. Dimetilcarbamato de (±)- <i>cis</i> -3-( <i>N,N</i> -dipropargilamino)-1-indanilo (110a) .....	332
4.24. Dimetilcarbamato de (±)- <i>trans</i> -3-( <i>N,N</i> -dipropargilamino)-1-indanilo (110b) .....	335
4.25. Dietilcarbamato de (±)- <i>cis</i> -3-( <i>N</i> -propargilamino)-1-indanilo (111a) .....	338
4.26. Dietilcarbamato de (±)- <i>trans</i> -3-( <i>N</i> -propargilamino)-1-indanilo (111b) .....	341
4.27. Dimetilcarbamato de (±)- <i>cis</i> -3-( <i>N</i> -propargilamino)-1-indanilo (112a) .....	344
4.28. Dimetilcarbamato de (±)- <i>trans</i> -3-( <i>N</i> -propargilamino)-1-indanilo (112b) .....	347
4.29. Dietilcarbamato de (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> )-(-)- <i>cis</i> -1-( <i>N,N</i> -dipropargilamino)-2-indanilo (113) ..	351
4.30. Dimetilcarbamato de (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> )-(-)- <i>cis</i> -1-( <i>N,N</i> -dipropargilamino)- 2-indanilo (114) .....	354
4.31. Dietilcarbamato de (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> )-(-)- <i>cis</i> -1-( <i>N</i> -propargilamino)-2-indanilo (115) .....	357
4.32. Dimetilcarbamato de (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> )-(-)- <i>cis</i> -1-( <i>N</i> -propargilamino)-2-indanilo (116) .....	360
4.33. Dietilcarbamato de (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> )-(+)- <i>cis</i> -1-( <i>N,N</i> -dipropargilamino)-2-indanilo (117) ..	363
4.34. Dimetilcarbamato de (1 <i>R</i> 2 <i>S</i> )-(+)- <i>cis</i> -1-( <i>N,N</i> -dipropargilamino)- 2-indanilo (118) .....	366
4.35. Dietilcarbamato de (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> )-(+)- <i>cis</i> -1-( <i>N</i> -propargilamino)-2-indanilo (119) .....	369
4.36. Dimetilcarbamato de (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> )-(+)- <i>cis</i> -1-( <i>N</i> -propargilamino)-2-indanilo (120) .....	372
5. ENSAYOS BIOLÓGICOS .....	375
6. CONCLUSIONS .....	391
7. ANEXOS .....	



## ***II. RELACIÓN DE ABREVIATURAS***



**II. RELACIÓN DE ABREVIATURAS**

Å	amstrongs
Aβ	péptido betaamiloide
Aβ42	péptido amiloide insoluble Aβ 1-42
AcCl	cloruro de acetilo
AChE	<i>acetilcolinesterasa</i>
ACN	Análogos Carbocíclicos de Nucleósidos
Ac <sub>2</sub> O	anhídrido acético
ACV	aciclovir
ADAGIO	Attenuation of Disease progression with Azilect Given Once Daily
ADN	ácido desoxirribonucleico
AlCl <sub>3</sub>	tricloruro de aluminio
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
an.	ancho
anh.	anhídrido/ anhidro
Ar	arilo
Ara-C	citarabina
ARN	ácido ribonucleico
arom	aromático
atm.	atmósferas
AZT	azidotimidina

*Relación de abreviaturas*

---

BChE	<i>butirilcolinesterasa</i>
BVDU	brivudina
Bz	Benzoilo
<sup>13</sup> C RMN	resonancia magnética nuclear de carbono 13
<i>ca.</i>	aproximadamente
cat	catalítico
CC <sub>50</sub>	concentración citotóxica 50
CCF	cromatografía en capa fina
CCM	concentración citotóxica mínima
CE <sub>50</sub>	concentración efectiva 50
CI <sub>50</sub>	concentración inhibitoria 50
cm	centímetros
CMV	citomegalovirus
cols.	colaboradores
COMT	<i>catecol-orto-metil-transferasa</i>
d	doblete
DCC	<i>dopadescarboxilasa</i>
dd	doble doblete
DDC	diciclohexilcarboimida
ddd	doble doblete de dobletes
DEAD	dietilazadicarboxilato

*Relación de abreviaturas*

---

DEPT	experimento monodimensional de $^{13}\text{C}$ con transferencia de polarización (distortionless enhancement by polarization transfer)
DIBAL-H	hidruro de di- <i>isobutil</i> aluminio
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO- $d_6$	dimetilsulfóxido deuterado
dt	doble triplete
EA	Enfermedad de Alzheimer
ed.	editorial
EI	Impacto electrónico (Electron Impact)
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EM	espectrometría de masas
EMAR	espectrometría de masas de alta resolución
EMEA	Agencia Europea del Medicamento
END	Enfermedades Neurodegenerativas
EP	Enfermedad de Parkinson
equiv.	equivalentes
ESI	Ionización por Electrospray (Electrospray Ionization)
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido

*Relación de abreviaturas*

---

FAB	Bombardeo por átomos rápidos (Fast Atom Bombardment)
FDA	Food and Drug Administration
g	gramos
GCV	ganciclovir
h	horas
HEL	célula embrionaria de pulmón humano
$^1\text{H}$ RMN	resonancia magnética nuclear de protón
Hz	hertzios
IChEs	inhibidores de <i>acetilcolinesterasa</i>
IE	impacto electrónico
IMAOs	Inhibidores de <i>monoamino oxidasa</i>
IR	infrarrojo
$J$	constante de acoplamiento
L-dopa	levodopa
$\text{LiBH}_4$	borohidruro de litio
M	concentración molar
MAO	<i>monoamino oxidasa</i>
MAO-A	<i>monoamino oxidasa A</i>
MAO-B	<i>monoamino oxidasa B</i>
mbar	milibar
MeCN	acetonitrilo



*Relación de abreviaturas*

---

mg	miligramos
MHz	megahertzios
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
mmol	milimoles
$m/z$	relación masa/carga
NA	noradrenalina
NaBH <sub>4</sub>	borohidruro de sodio
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
NCS	<i>N</i> -clorosuccinimida
NIS	<i>N</i> -yodosuccinimida
nm	nanómetros
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NNRTIs	inhibidores no nucleosídicos de la <i>retrotranscriptasa</i>
NRTIs	inhibidores nucleosídicos de la <i>retrotranscriptasa</i>
NtRTIs	inhibidores nucleotídicos de la <i>retrotranscriptasa</i>
°C	grado Celsius
p.	página
p. eb.	punto de ebullición
p. ej.	por ejemplo

*Relación de abreviaturas*

---

p. f.	punto de fusión
Pis	inhibidores de la <i>proteasa vírica</i>
PLE	<i>esterasa</i> del hígado de cerdo
PPA	proteína precursora de A $\beta$
PPh <sub>3</sub>	trifenilfosfina
ppm	partes por millón
q	quintuplete
QSAR	Quantitative Structure-activity Relationship
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RT	<i>retrotranscriptasa</i>
s	singlete
s.an.	singlete ancho
(S)-DPHA	(S)-9-(2,3-dihidroxipropil)adenina
S <sub>A</sub> E	sustitución aromática electrófila
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
S <sub>N</sub> Ar	reacción de Sustitución Nucleófila Aromática
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
t	triplete
t.a.	temperatura ambiente
TBDMSCl	cloruro de terbutildimetilsililo

*Relación de abreviaturas*

---

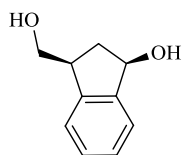
TFA	ácido trifluoroacético
(TFA) <sub>2</sub> O	anhídrido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
VHS-1	Virus Herpes Simplex tipo 1
VHS-2	Virus Herpes Simplex tipo 2
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
$\delta$	desplazamiento químico
$\mu\text{g}$	microgramos
$\mu\text{L}$	microlitros
$\mu\text{M}$	micromolar
$\nu$	frecuencia



### ***III. RELACIÓN DE COMPUESTOS DESCRITOS***

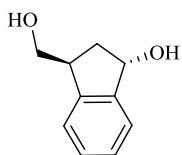


### III. RELACIÓN DE COMPUESTOS DESCRITOS



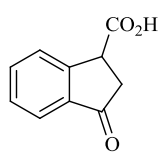
**55a**

$C_{10}H_{12}O_2$   
M: 164.20



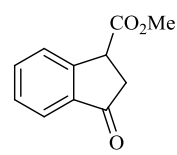
**55b**

$C_{10}H_{12}O_2$   
M: 164.20



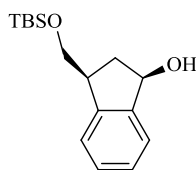
**57**

$C_{10}H_8O_3$   
M: 176.17



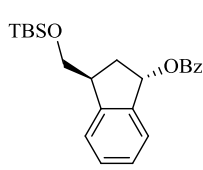
**58**

$C_{11}H_{10}O_3$   
M: 190.20



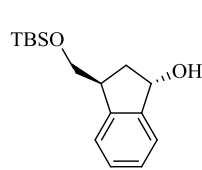
**59**

$C_{16}H_{26}O_2Si$   
M: 278.46



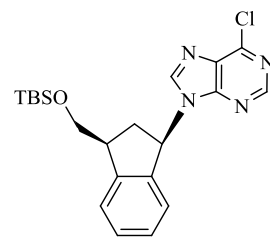
**60**

$C_{23}H_{30}O_3Si$   
M: 382.57



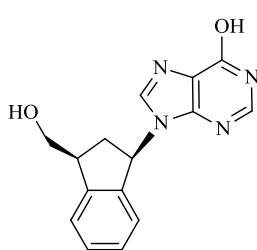
**61**

$C_{16}H_{26}O_2Si$   
M: 278.17



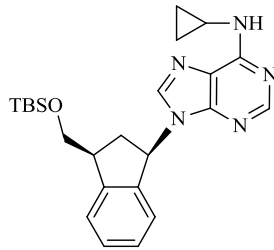
**62**

$C_{21}H_{27}ClN_4OSi$   
M: 415.00



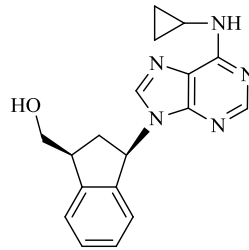
**63**

$C_{15}H_{14}N_4O_2$   
M: 282.30



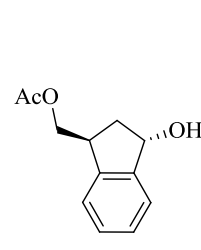
**64**

$C_{24}H_{33}N_5OSi$   
M: 435.64



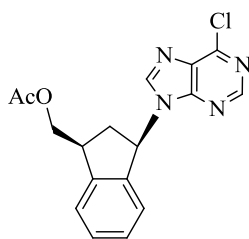
**65**

$C_{18}H_{19}N_5O$   
M: 321.38



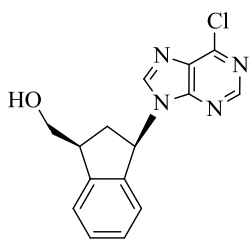
**66**

$C_{12}H_{14}O_3$   
M: 206.09



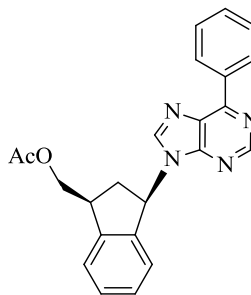
**67**

$C_{17}H_{15}ClN_4O_2$   
M: 342.78



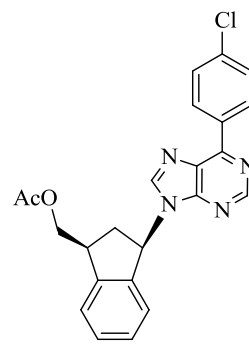
**68**

$C_{15}H_{13}ClN_4O$   
M: 300.74



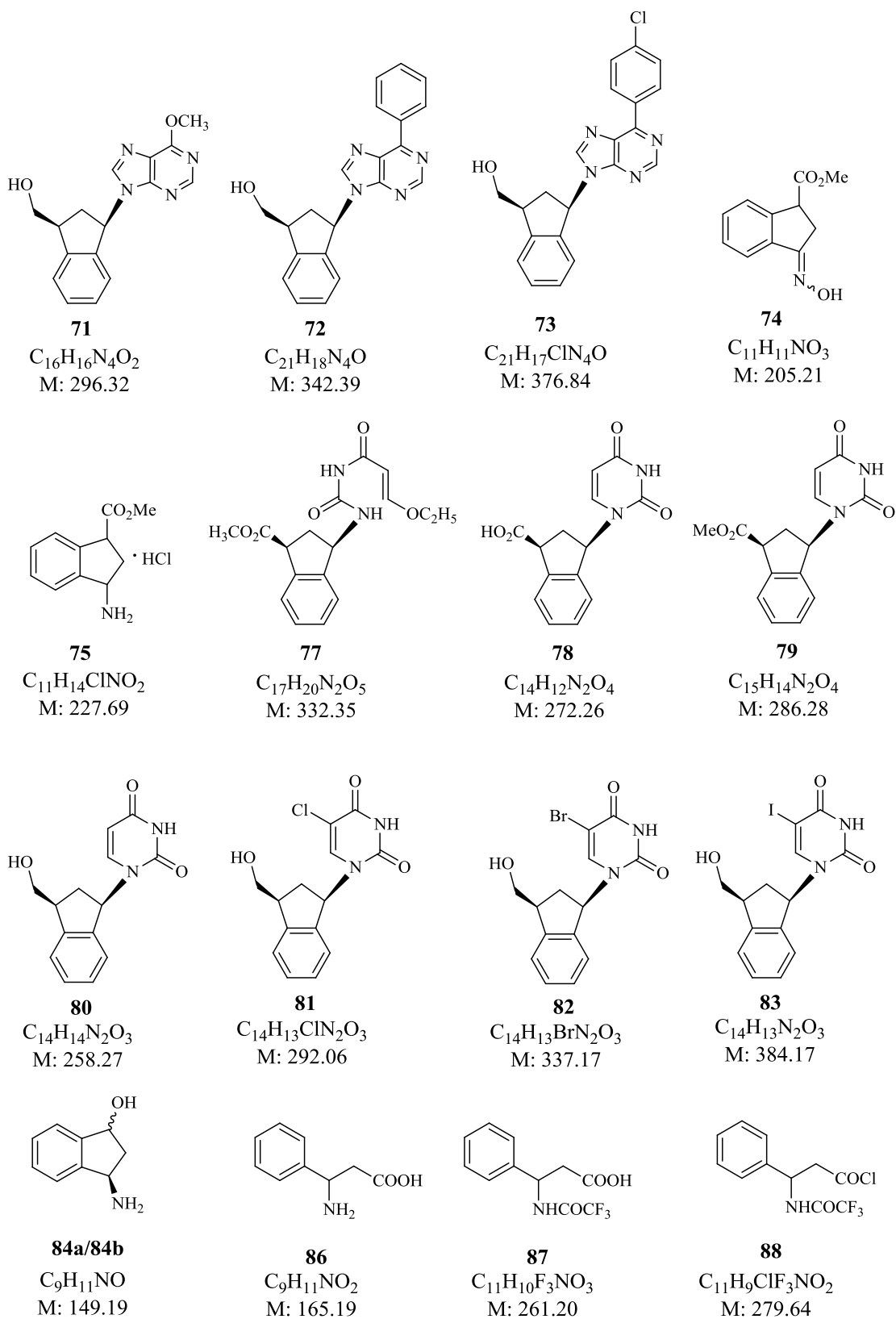
**69**

$C_{23}H_{20}N_4O_2$   
M: 384.16

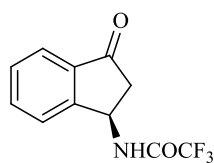


**70**

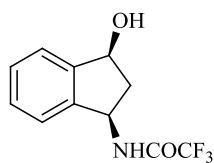
$C_{23}H_{19}ClN_4O_2$   
M: 418.88



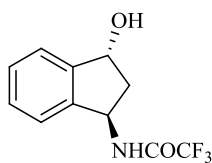




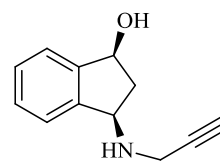
**89**  
 $C_{11}H_8F_3NO_2$   
 M: 243.18



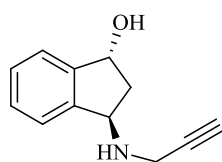
**90a**  
 $C_{11}H_{10}F_3NO_2$   
 M: 245.20



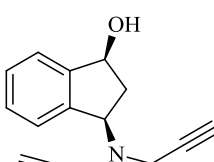
**90b**  
 $C_{11}H_{10}F_3NO_2$   
 M: 245.20



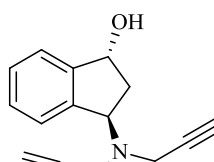
**91a**  
 $C_{12}H_{13}NO$   
 M: 187.24



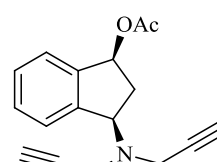
**91b**  
 $C_{12}H_{13}NO$   
 M: 187.24



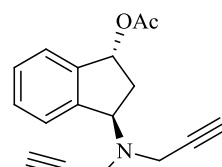
**92a**  
 $C_{15}H_{15}NO$   
 M: 225.29



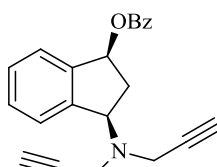
**92b**  
 $C_{15}H_{15}NO$   
 M: 225.29



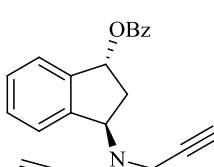
**93a**  
 $C_{17}H_{17}NO_2$   
 M: 267.32



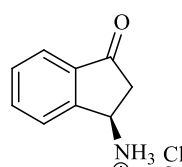
**93b**  
 $C_{17}H_{17}NO_2$   
 M: 267.32



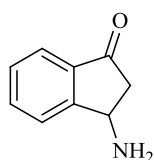
**94a**  
 $C_{22}H_{19}NO_2$   
 M: 329.39



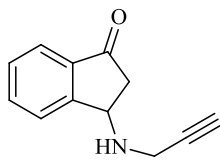
**94b**  
 $C_{22}H_{19}NO_2$   
 M: 329.39



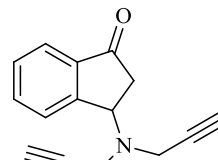
**95**  
 $C_9H_{10}ClNO$   
 M: 183.63



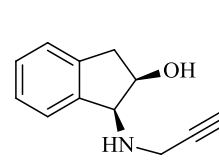
**96**  
 $C_9H_9NO$   
 M: 147.17



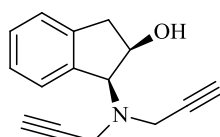
**97**  
 $C_{12}H_{11}NO$   
 M: 185.22



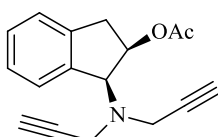
**98**  
 $C_{15}H_{13}NO$   
 M: 223.27



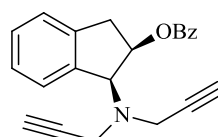
**100**  
 $C_{12}H_{11}NO$   
 M: 187.29



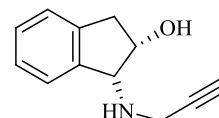
**101**  
 $C_{15}H_{15}NO$   
 M: 225.29



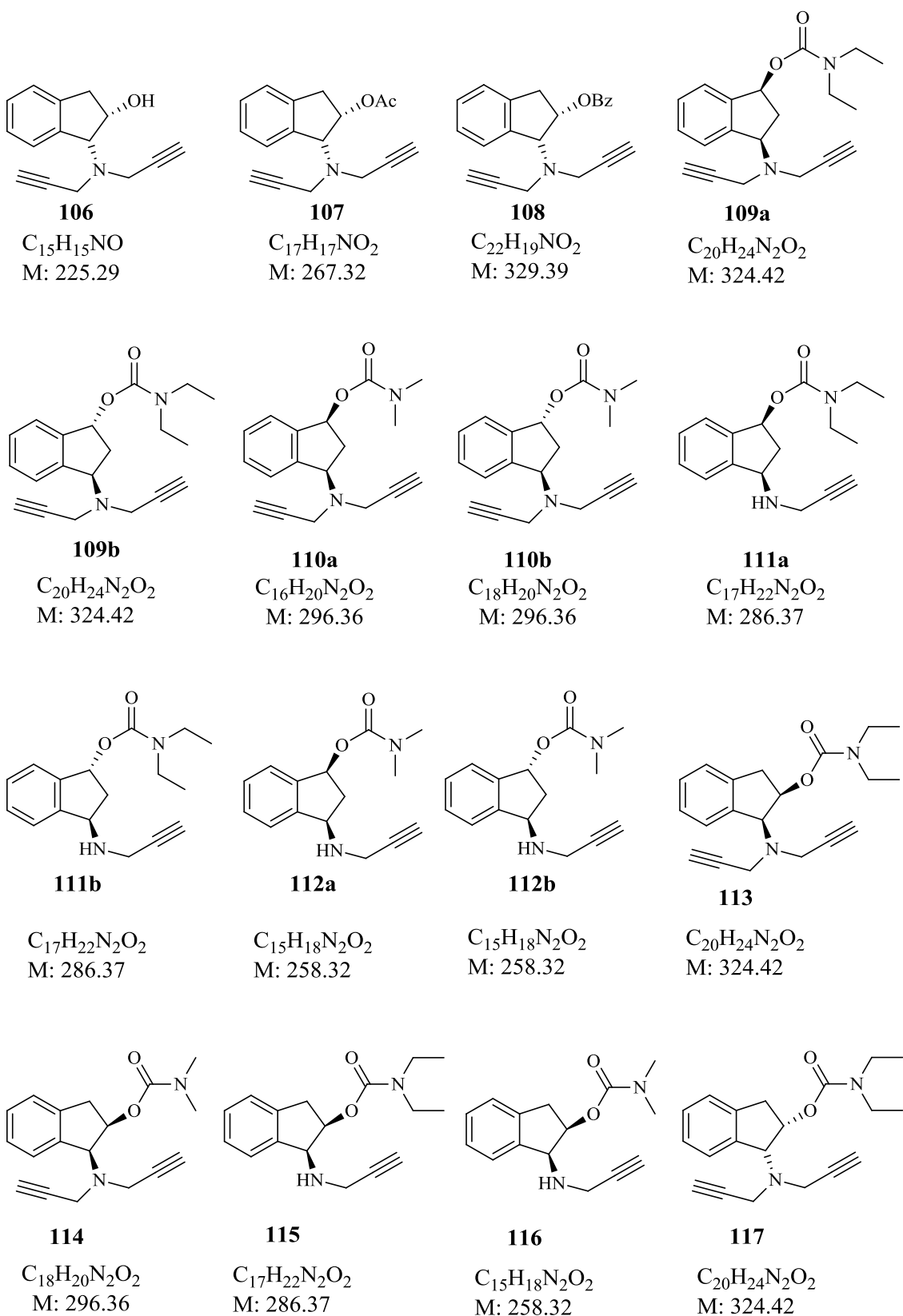
**102**  
 $C_{17}H_{17}NO_2$   
 M: 267.32

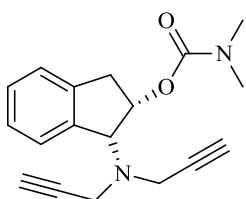


**103**  
 $C_{22}H_{19}NO_2$   
 M: 329.39



**105**  
 $C_{15}H_{15}NO$   
 M: 225.29

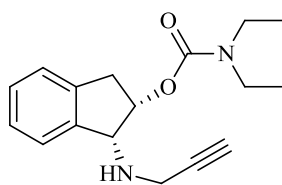




**118**

$C_{18}H_{20}N_2O_2$

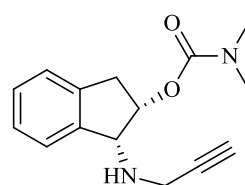
M: 296.36



**119**

$C_{17}H_{22}N_2O_2$

M: 286.37



**120**

$C_{15}H_{18}N_2O_2$

M: 258.32



#### ***IV. SUMMARY***



#### **IV. SUMMARY**

The indan skeleton is a bicyclic structure, found in a variety of pharmaceutically active compounds, such as agents with anti-inflammatory, neuroprotective, antiviral, antihypertensive, antimalarial activity, etc.

This thesis deals with the synthesis of new compounds with biological activity and, consequently, with therapeutic utility. The paper is divided in two chapters, the first one is concerned with the synthesis and antiviral activities of novel purinyl- and pyrimidinyl-carbanucleosides derived from indan and the second one deals with the synthesis of new derivatives with potential neuromodulator activity.

##### **Chapter 1. Synthesis and biological evaluation of new purinyl- and pyrimidinyl-carbanucleosides derived from indan.**

The nucleoside analogues are a family of compounds structurally similar to natural nucleosides, which are the essential links of nucleic acids (DNA and RNA). Their biological importance in the transmission of genetic information, transcription and protein synthesis is well known.

In the last years, one of the most active research fields in the area of antitumor and antiviral medicinal chemistry is the introduction of small modifications in this type of molecules by replacing these natural nucleosides with modified analogues that maintain high structural similarity but are capable of blocking the enzymatic process of the virus or the malignant cells. Hence, it is possible to take advantage of the selective toxicity towards the malignant cells or viruses due to the enzymatic differences between normal and malignant cells or those between host cells and viruses.

The modifications made in the structure of natural compounds can affect the part of the sugar (or pseudosugar), the purine or pyrimidine base, or even both sides, which results in a large number of compounds which are classified as nucleosides analogues.

One of the most important discoveries in the field of the nucleoside analogues has been the development of the Carbocyclic Nucleoside Analogues (CNA) or carbanucleosides. These compounds are nucleosides in which the oxygen atom of the furanose ring is substituted by a methylene group.

Structurally, the presence of a carbon-nitrogen bond instead of the classical *N*-glycosidic bond of natural nucleosides results in greater chemical and metabolic stability. As a result, these carbanucleosides will be more resistant to enzymatic degradation by the hydrolases; however,

and due to their structural similarity, they may be substrates of the enzymes that phosphorylate and activate them so that they can be integrated in DNA and RNA chains, where they inhibit the replication of the genome of the virus or the cancer cells, or act as suicide inhibitors of the enzymes involved in the nucleoside metabolism.

Although the majority of carbocyclic nucleosides have a synthetic origin, two of the most interesting compounds, **aristeromycin** and **neplanocin A** are natural. The D-(-)-aristeromycin was first isolated from *Streptomyces citricolor* in 1968, although the racemic form was chemically synthesized in 1966.

The discovery of neplanocin A was made later, in 1981. The fact that these two carbocyclic furanose nucleosides exhibit significant antitumor as well as antiviral activity led to the synthesis of compounds with an interesting biological activity in antitumor and antiviral chemotherapy.

Thus, **(-)-carbovir**, a potent and selective inhibitor of HIV-1 *in vitro*, and **abacavir**, a cyclopropylamine derivative of this, are molecules which are particularly promising in this area.

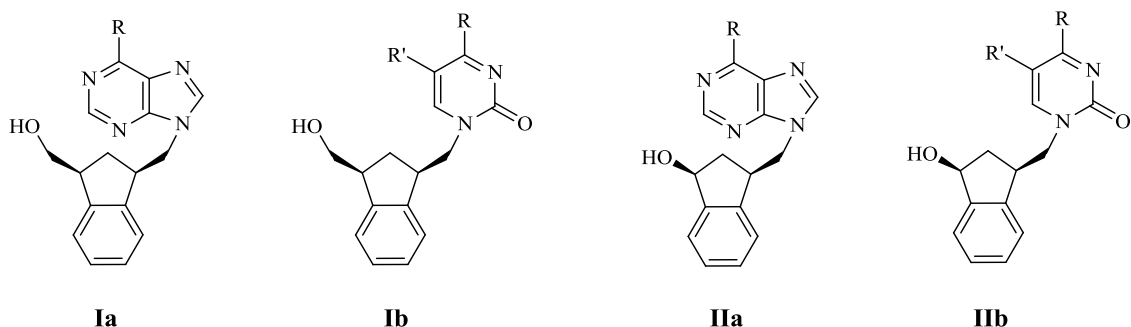
Abacavir emerged in an attempt to increase the oral bioavailability of carbovir and thus maximize anti-HIV activity. In fact, this activity is equivalent or superior to that of **azidothymidine (AZT)**, which was the first drug approved by the FDA for the treatment of HIV, and its penetration into the brain and spinal cord (reservoir places of the virus) is as good as that of AZT.

So abacavir has not the pharmacological and toxicological deficiencies of the other nucleoside reverse transcriptase inhibitors due to its intracellular activation. Both of these compounds are cyclopentenyl carbanucleosides and their anti-HIV capacity has stimulated the development of new carbanucleosides in which the carbocycle is a cyclopentane ring.

With a view to increasing the lipophilia of these compounds, the replacement of the  $\pi$ -alkene cloud with a  $\pi$ -aromatic cloud, that is, the cyclopentane ring is substituted with an indan ring was found to be interesting.

And so we have started a research line in our group aimed at the synthesis and biological evaluation as antiviral and/or antitumor new carbanucleosides in which the pseudosugar is an indan ring. In the last years we have prepared and biologically evaluated different series of new 1'-homo derivative (**I**) and 5'-nor-1'-homo derivative (**II**) derived from the indan ring bearing purine and pyrimidinyl bases.

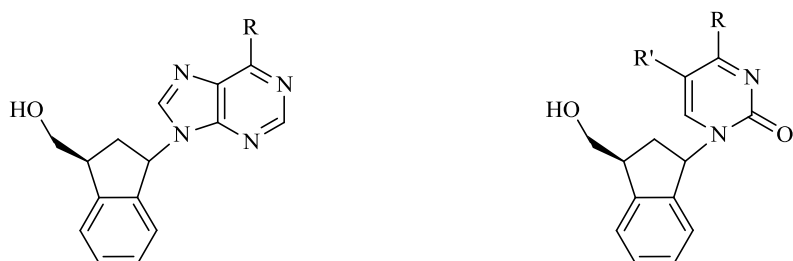




These compounds were synthesized with the aim of increasing the liposolubility and provide an easier access to the central nervous system, which is, as it has already been mentioned, a significant reservoir of HIV and other viruses.

As a logical continuation of our research into the preparation and pharmacological evaluation of novel carbanucleosides, we have synthesized the “authentic” nucleoside analogues derived from indan, that is, those in which the link between the carbocycle bearing the base (purine or pyrimidine) and the hydroxyl group is the same as in natural nucleosides.

Therefore, as the first specific objective of this work, we have synthesized the purinyl- (**IIIa**) and pyrimidinyl-carbanucleosides (**IIIb**) derived from indan ring.



**IIIa**

**63** R = OH  
**65** R = NH-*c*Pr  
**68** R = Cl  
**71** R = OMe  
**72** R = Ph  
**73** R = 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>

**IIIb**

**80** R = Cl  
**81** R = Br  
**82** R = I

In conclusion in this chapter, we have described the synthesis of nine novel carbocyclic nucleosides that are indan derivatives (**63**, **65**, **68**, **71**, **72**, **73**, **80**, **81** and **82**) with a pseudosugar based on indanol, a template in which the double bond of the cyclopentenyl nucleosides is embedded in a benzene ring.

Also the new synthesized derivatives were subjected to an initial pharmacological evaluation process, against a wide variety of viruses, showing, some of them, interesting antiviral effects.

## **Chapter 2. Development of new neuroprotective indan derivatives as a new therapeutic strategy for treating of neurodegenerative diseases.**

Neurodegenerative diseases represent, along with vascular and oncological diseases, the leading cause of mortality and morbidity in the Spanish population. Currently, about 800.000 people in our country are diagnosed with a neurodegenerative disease.

These disorders are characterized by a decrease of the number of cells in certain neuronal populations, which is clinically reflected in the appearance of specific symptoms.

Over 100 neurodegenerative diseases are known; Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis are the most important of them whether it is for their frequency or their severity.

In this chapter, we will focus our attention on Parkinson's disease and Alzheimer's disease.

Parkinson's disease (PD) is a chronic, progressive neurological disorder characterized by predominant motor symptoms, such as bradykinesia, resting tremor, rigidity and postural instability.

PD affects approximately 2% of the population over 65 years of age older than 65 so it is estimated that, at the moment, there are 150,000 diagnosed patients living in Spain, being the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease (AD).

It is characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and by the accumulation of intracellular fibrillar aggregates, the *Lewy Bodies*.

The result is a decrease of the dopamine values, when these levels decrease the typical symptoms of this disease appear.

Its etiopathology is unknown and probably multifactorial. Several elements are involved, such as genetic and environmental factors, as well as oxidative damage and alterations in the protein folding and mitochondrial function which leads to an accelerate brain aging or apoptosis.

Currently, the therapeutic strategy is mainly based, from the pharmacological point of view, on the enhancement of central dopaminergic activity.

The most used and effective drug to increase the deficient levels of dopamine is **L-dopa**, a dopamine precursor in the Central Nervous System (CNS). We cannot directly administer the dopamine because it does not cross the blood-brain barrier due to its high polarity.

It is typically co-administered with an inhibitor of the peripheral *dopa decarboxylase* (DCC), such as **carbidopa** or **benserazide**, avoiding the degradation of the L-dopa and increasing its way to the CNS in a 70%. Neither carbidopa nor benserazide can cross the blood-brain barrier, so they only block the action of *dopa decarboxylase* at a peripheral level.

Moreover, the *catechol-ortho-methyltransferase* (COMT) is another enzyme that is also responsible of metabolizing L-dopa, so we have to administer COMT inhibitors, such as **entacapone**, saving levodopa from COMT and prolonging their action.

Another way to increase the concentration of dopamine is achieved with the administration of selective and irreversible inhibitors of *monoamino oxidase B* (MAO-B). These inhibitors include **selegiline** and **rasagiline**, which block the metabolism of the dopamine induced by MAO-B and prolong its action time in the nigrostriatal synapsis.

Used in monotherapy, selegiline provides a moderate symptomatic efficacy. However, there is no evidence that when this drug is administered in early stages it significantly delays the progression of the disease.

When selegiline is co-administered with L-dopa, the required quantity of the latter is reduced, but also delays the progression of the disease and it does not prevent long-term dyskinesias. In conclusion, there is no clear evidence that this drug has a neuroprotective effect. Also, it presents a number of side effects due to the amphetamine metabolites generated.

Rasagiline was developed to create a selective inhibitor of MAO-B which lacks the side effects of selegiline. It was approved by the FDA in May 2006 for the treatment of Parkinson's disease as monotherapy in the initial phase and as an adjunct to L-dopa in more advanced stages.

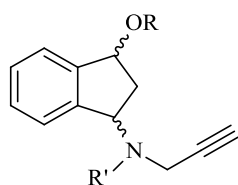
Also, rasagiline produces aminoindane as a main metabolite, a compound reported to have an anti-Parkinson activity of its own.

Note that rasagiline has an additional neuroprotective activity due to an antiapoptotic effect, being a type of neuronal death in the neurodegenerative diseases. Studies of the structure-activity relationship demonstrated that the propargyl moiety of the rasagiline is essential for this neuroprotection.

The interaction between rasagiline and the protein involves a number of Van der Waals contacts with several of the amino acids residues in the cavity. The indan ring of rasagiline is perpendicular to the *re* face of the covalent FAD, which itself forms the amine binding site, the aromatic moiety of the rasagiline interacts with the side chains of the residues of Tyr 398, Tyr 435 and Tyr 188. The propargyl group is aligned on the N5 atom of the FAD, interacting covalently with the cofactor and the only H bond established by rasagiline involves one of the four ordered water molecules, located inside the cavity, which interacts with the N10 atom. All these interactions are mainly established in the same face of the molecule.

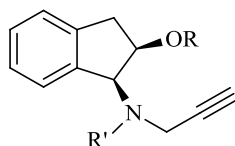
For this reason, in our research group and using the experience gained in recent years in the synthesis of indan derivatives, we have considered interesting to start a line for the preparation of potential neuroprotective agents derived from indan as a new therapeutic strategy for the treatment of neurodegenerative diseases.

Therefore, as the first objective of this second chapter we have proposed the synthesis of new derivatives and/or analogues of rasagiline differently substituted at the position 3 of the indan ring (**IV**) and at the position 2 (**Va-b**) of the same, with one or two propargyl groups on the nitrogen atom, in order to generate new anchor points with the MAO-B which will increase affinity and enhance the inhibitory activity.



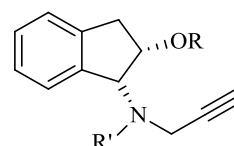
**IV**

R = H, Ac, Bz  
R' = H, CH<sub>2</sub>-C≡CH



**Va**

R = H, Ac, Bz  
R' = H, CH<sub>2</sub>-C≡CH



**Vb**

R = H, Ac, Bz  
R' = H, CH<sub>2</sub>-C≡CH

This allows us to study the effect of the inclusion of different substituents in the position 3 or 2 of the indan ring in the inhibitory properties on MAO-B, which will provide information for the optimization at the time of resuming the synthesis of this type of compounds.

Current therapeutic approaches suggest that drugs acting on a single target may be insufficient for the treatment of multifactorial neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Huntington's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis, all characterized by the coexistence of multiple etiopathologies.

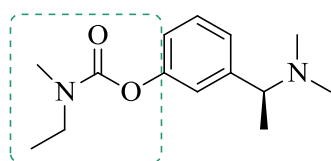
These include, among others, oxidative stress and reactive oxygen species formation, protein misfolding and aggregation mitochondrial dysfunction, inflammation, metal dyshomeostasis and accumulation at the sites of neurodegeneration.

Hence, it is unlikely that a single pharmacological action may provide a satisfactory and comprehensive therapeutic solution for such patients. Such therapy is more likely to be achieved by the use of compounds that incorporate several pharmacological traits into a single molecular entity and will work in a synergistic manner, i. e. by the use of dual action drugs.

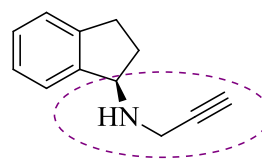
A dual action drug is a hybrid compound that contains two (or more) structural domains with different biological functions. Amongst dual action drugs, a class of compounds known as dual inhibitors (a single molecule possessing dual inhibitory activity) is experiencing a surge in interest in both scientific and clinical fields.

**Ladostigil** [(*N*-propargyl-1*R*-aminoindan-6-yl)-ethylmethylcarbamate] is a novel dual inhibitor, useful for the treatment of PD, AD and dementia with Lewy Bodies (parkinsonism with dementia), and it contains the structure of the rasagiline. It was designed with the goal of maintaining the neuroprotective activity of rasagiline and presenting the necessary therapeutic requirements to delay the progression of these neurodegenerative diseases.

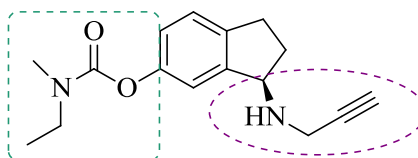
In order to do this, it combines the pharmacophore groups of rasagiline (selective inhibitor of MAO-B) and those of **rivastigmine** (inhibitor of *acetyl* and *butyrylcholinesterase*) in the same molecule. It possesses multiple therapeutic activities as it reduces apoptosis and stimulates the processing of amyloid precursor protein (APP), thereby reducing the possibility of creation of toxic  $\beta$ -amyloid.



**Rivastigmine**



**Rasagiline**



**Ladostigil**

So compounds with such dual *acetylcholinesterase* (AChE) and MAO-B inhibitory activities are expected to have potential for the treatment of Alzheimer's disease, a neurodegenerative disease becoming more and more common, having in Spain about 600.000 diagnosed patients.

Alzheimer's disease involves the parts of the brain that control thought, memory, and language. It is characterized by functional impairment and progressive loss of neurons, resulting in a gradual decline of the memory and of other cognitive functions, and leading to dementia.

It is a serious and degenerative disorder caused by the gradual loss of brain neurons, whose etiopathology is unknown, there being three principal hypotheses: the deficit of acetylcholine, the accumulation of amiloide and/or tau, and metabolic disorders.

1. The cholinergic hypothesis was first proposed in 1976 and has since led to the development of the only cholinergic drugs currently approved to treat mild to moderate AD.

This theory was based on the finding that a loss of the cholinergic function in the CNS is commonly observed in the brains of AD patients and contributes significantly to the cognitive symptoms associated with this disease and advanced age, thus offering clear direction for treatment strategies.

Also, a progressive loss of nicotinic receptors along the course of the disease has also been described, and has shown the important role of these receptors in learning and memory deficits.

This hypothesis has not maintained a global support because the drugs used to treat the cholinergic deficiency have reduced effectiveness in the prevention or cure of the Alzheimer's disease. In spite of this, treatment with this type of inhibitors has been established as the standard treatment in patients with mild to moderate EA.

Acetylcholinesterase inhibitors (IACHes) have beneficial effects on cognitive, functional and behavioral symptoms. Currently, there are three cholinergic inhibitors approved by the FDA for the treatment of AD: **donepezil** (1998), rivastigmine (2000) and **galantamine** (2001).

Donepezil and rivastigmine are selective inhibitors of *acetylcholinesterase*, while galantamine acts as an allosteric ligand for nicotinic receptors of acetylcholine, increasing its the pre- and post-synaptic release, improving cholinergic transmission.

Treatment of AD with these inhibitors is only palliative or symptomatic because these drugs do not act on the pathogenic mechanisms of the disease. The most common therapeutic effect of them is the delay of the progression of the clinic symptoms compared to the expected deterioration.

**Memantine** is the fourth drug approved by the FDA for the treatment of Alzheimer's disease. It is a low-affinity voltage-dependent, uncompetitive antagonist at glutamatergic *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and it is able to protect neurons from glutamate excitotoxicity without completely eliminating the glutamate necessary for normal neurological function.

Memantine, like acetylcholinesterase inhibitors, slow the progression of the dementia, but do not stop the decline.

2. The amyloid hypothesis holds that the accumulation of the amyloid  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) in  $\beta$  amyloids deposits is the key pathological event driving neurodegeneration in AD.

Neuritic or senile plaques and neurofibrillary tangles are characteristic features of Alzheimer's disease. The main component of the senile plaques is the amyloid substance and the pathologic process which leads to the formation of neurofibrillar tangles, with high content in phosphorylated *tau* protein, is due to an imbalance between production and clearance of  $A\beta$ .

Most current Alzheimer's disease therapies in advanced phases of development aim at the production, aggregation, or accumulation of  $A\beta$  peptide. Translational models suggest that anti- $A\beta$  therapies may be highly effective if tested as agents to prevent or delay the development of the disease or as therapies for asymptomatic patients with early signs of AD pathology.

However, these therapies are currently being tested in symptomatic patients, and its effectiveness on them is likely to be much less, if any.

3. The metabolic hypothesis suggests that the impairment of insulin signaling in the brain has been linked to neurodegenerative disease because in these circumstances neurons are more vulnerable to toxic influences.

However, there is still controversy over the role of insulin signaling in the regulation of brain glucose metabolism, learning and memory function, and the development of the neurodegenerative diseases. But the treatment of these patients with insulin for long periods of time is unreasonable, because this can aggravate the desensitization of the insulin receptors.

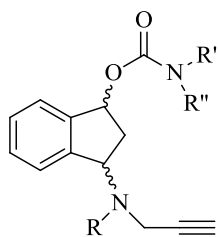
We conclude there are several hypotheses and biochemical events which try to explain the reason of AD, such as degeneration of cholinergic neurons, formation of senile plaques and neurofibrillar tangles, oxidative stress, accumulation of metals in brain regions associated with neurodegeneration, inflammatory process, apoptosis, deficiency of neurotrophic factors, etc.

Hence, the current therapeutic approach in which drug candidates are designed to possess diverse pharmacological properties and act on multiple targets has stimulated the development of dual action drugs.

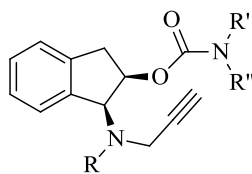
Moreover, many studies have suggested that MAO and AChE inhibition may decrease the deposition of  $\beta$ -amyloid, and thus inhibitors of these enzymes may be good candidates for AD treatment drugs. As mentioned above, the main example of this group of candidates to drugs is ladostigil.

Based on this reasoning, as a second objective of this chapter, we have proposed the synthesis of new compounds by amalgamating the neuroprotective/ neurorestorative drug, rasagiline, into a carbamate cholinesterase moiety to prepare multimodal compounds.

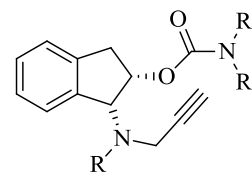
Therefore, we have found interesting transforming the different hydroxy derivatives prepared by us, into carbamate derivatives, both type 1,3 (**VII**) as type 1,2 (**VIIIa-b**), in order to synthesize drug candidates with dual activity as presented by ladostigil.



**VII** R = H, CH<sub>2</sub>-C≡CH  
R' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
R'' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



**VIIIa** R = H, CH<sub>2</sub>-C≡CH  
R' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
R'' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



**VIIIb** R = H, CH<sub>2</sub>-C≡CH  
R' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
R'' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

These compounds present a number of structural variations with respect of ladostigil:

1. Carbamate group located in the aromatic ring in the ladostigil is now situated in the carbon 3 (**VII**) and carbon 2 (**VIIIa-b**) in the cyclopentane ring.
2. The ethyl methylcarbamate structure is replaced by a dimethyl or diethylcarbamate structure.
3. The new derivatives can have one or two propargyl groups on the amino moiety.

So in this second chapter we can say we have developed a synthetic method for obtaining new rasagiline derivatives substituted in the position 3 and in the position 2 of the indan ring and, in some cases, a second propargyl group is incorporated on the nitrogen atom.



## Summary

---

In addition, we have developed a synthetic method for obtaining new ladostigil derivatives substituted in the position 3 and in the position 2 of the indan ring.

All these compounds have been subjected to an initial pharmacological evaluation, in order to find out their inhibitory capacity against the two isoforms of MAO, *cholinesterases* and their neuroprotective capacity both in absence and in presence of some neurotoxic agents.

Finally, we have started carrying out different theoretical studies to find out the neuroprotective capacity of the prepared compounds, both docking studies such as the application of QSAR methods.



***CAPÍTULO 1: SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS  
CARBANUCLEÓSIDOS, PORTADORES DE BASES PÚRICAS O  
PIRIMIDÍNICAS, BASADOS EN EL ANILLO DE INDANO***



## ***1. INTRODUCCIÓN***



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. EL ANILLO DE INDANO

El anillo de indano consiste en un benceno fundido a un ciclopentano, pudiendo presentar sustituyentes tanto en el anillo aromático como en el anillo alifático. La rigidez y la planaridad son características importantes de este esqueleto que está presente en una gran variedad de compuestos activos farmacológicamente.<sup>1</sup> Entre ellos podemos destacar, **figura 1**, fármacos usados en el tratamiento del Alzheimer como el **Aricept®**,<sup>2</sup> en el tratamiento del Parkinson como la **Rasagilina**,<sup>3</sup> antivirales como es el caso del **Indinavir®**,<sup>4</sup> agentes con actividad antihipertensiva como la **Irindalona**,<sup>5</sup> inhibidores de la p38 MAP quinasas con actividad antiinflamatoria,<sup>6</sup> antiarrítmicos como la **Aprindina**,<sup>7</sup> inhibidores de la agregación para el tratamiento de la osteoartritis,<sup>8</sup> antimaláricos como el **KNI-10006**,<sup>9</sup> fármacos para el tratamiento de la insuficiencia renal, cardíaca, etc.<sup>10,11</sup>

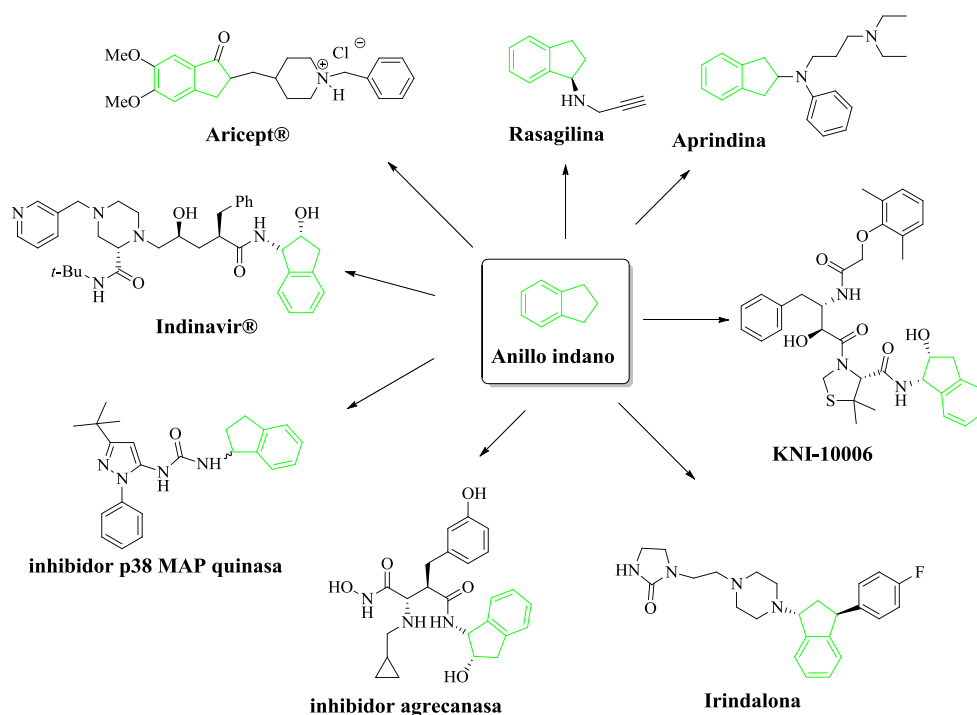


Figura 1

<sup>1</sup> Ferraz, H. M. C.; Aguilar, A. M. L.; Silva, F. Jr.; Craveiro, M. V. *Quim. Nova* **2005**, 28, 703.

<sup>2</sup> Viayna, E. et al. *ChemMedChem* **2010**, 5, 1855.

<sup>3</sup> Bar-Am, O.; Weinreb, O.; Amit, T.; Youdim, M. B. H. *J. Neurochem.* **2010**, 112, 1131.

<sup>4</sup> Mehelou, Y.; De Clerq, E. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 521.

<sup>5</sup> Bogeso, K. P.; Arnt, J.; Boeck, V.; Christensen, A. V.; Hyttel, J.; Jensen, K. G. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 2247.

<sup>6</sup> Regan, J.; Breitfelder, S. et al. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2994.

<sup>7</sup> Tsuchishita, Y.; Fukumoto, K.; Kusomoto, M.; Ueno, K. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, 32 (4), 637.

<sup>8</sup> Yao, W.; Wasserman, Z. R. et al. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3347.

<sup>9</sup> Kiso, A.; Hidaka, K.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Nezami, A.; Freire, E.; Kiso, Y. *J. Peptide Sci.* **2004**, 10, 641.

<sup>10</sup> Navarro, C.; Csáky, A. G. *Synthesis* **2009**, 5, 860.

<sup>11</sup> Uiterweerd, P. G. H.; Sluis, M.; Kaptein, B.; Lange, B.; Kellogg, R. M.; Broxterman, Q. B. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, 14, 3479.

Con esto, ponemos de manifiesto la utilidad del anillo de indano como elemento central de muchos compuestos que, convenientemente funcionalizados, permiten concebir la gran variabilidad de acciones farmacológicas de dichos compuestos candidatos a fármacos.

Por este motivo nos ha parecido de interés utilizar el anillo de indano como esqueleto fundamental a partir del cual podemos preparar candidatos a fármacos con potencial actividad antiviral, anticancerígena o neuroprotectora.

Por ello nos plantemos dirigir los trabajos encaminados a la realización de esta tesis doctoral en dos capítulos perfectamente diferenciados:

- ✓ Capítulo 1: “Síntesis y evaluación biológica de nuevos carbanucleósidos, portadores de bases púricas o pirimidínicas, basados en el anillo de indano”.
- ✓ Capítulo 2: “Desarrollo de nuevos neuroprotectores derivados del indano como nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas”.



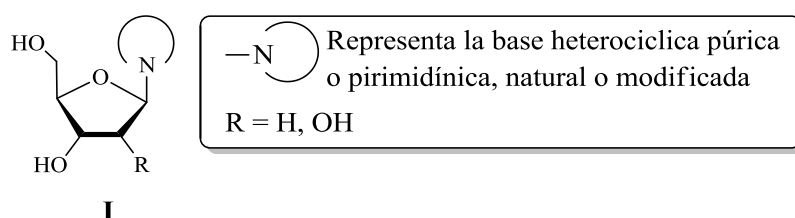
## 1.2. ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS

### 1.2.1. Aspectos generales

El descubrimiento de la estructura de ADN,<sup>12</sup> modelo en doble hélice propuesto en 1953 por Watson y Crick, revolucionó campos como la genética o la biología molecular aportando una mejor comprensión de los procesos bioquímicos por los que los ácidos nucleicos controlan la viabilidad celular *in vivo*, lo que condujo al diseño y desarrollo de fármacos que pudieran interferir con uno o más de los procesos controlados por dichas macromoléculas.

Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) son moléculas de las que depende el almacenamiento de la información genética, su transmisión y la transcripción a síntesis proteica de todos los seres vivos. Están formados por una o dos cadenas monoméricas llamadas nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un azúcar (2-desoxirribosa en el ADN o ribosa en el caso de ARN), una base nitrogenada, púrica o pirimidínica, y una molécula de ácido fosfórico. Los nucleósidos obtenidos inicialmente, a partir de productos naturales, son la unidad resultante de la unión mediante un enlace  $\beta$ -N-glicosídico, de un azúcar y una base nitrogenada, sin ácido fosfórico.

Los análogos de nucleósidos constituyen un grupo de compuestos estructuralmente relacionados con los nucleósidos naturales **I** (Figura 2).



**Figura 2**

Debido a ello en los últimos años, uno de los objetivos en la química terapéutica antitumoral<sup>13</sup> y antiviral,<sup>14,15</sup> es el reemplazamiento de estos nucleósidos naturales por análogos modificados que mantengan una alta similitud estructural pero que sean capaces de bloquear los procesos enzimáticos del virus o de las células malignas. Además, con la preparación de los análogos de nucleósidos, se pretende conseguir una acción, no sólo efectiva, sino también selectiva, utilizando las diferencias enzimáticas existentes entre los virus y la célula

<sup>12</sup> Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, 171, 737.

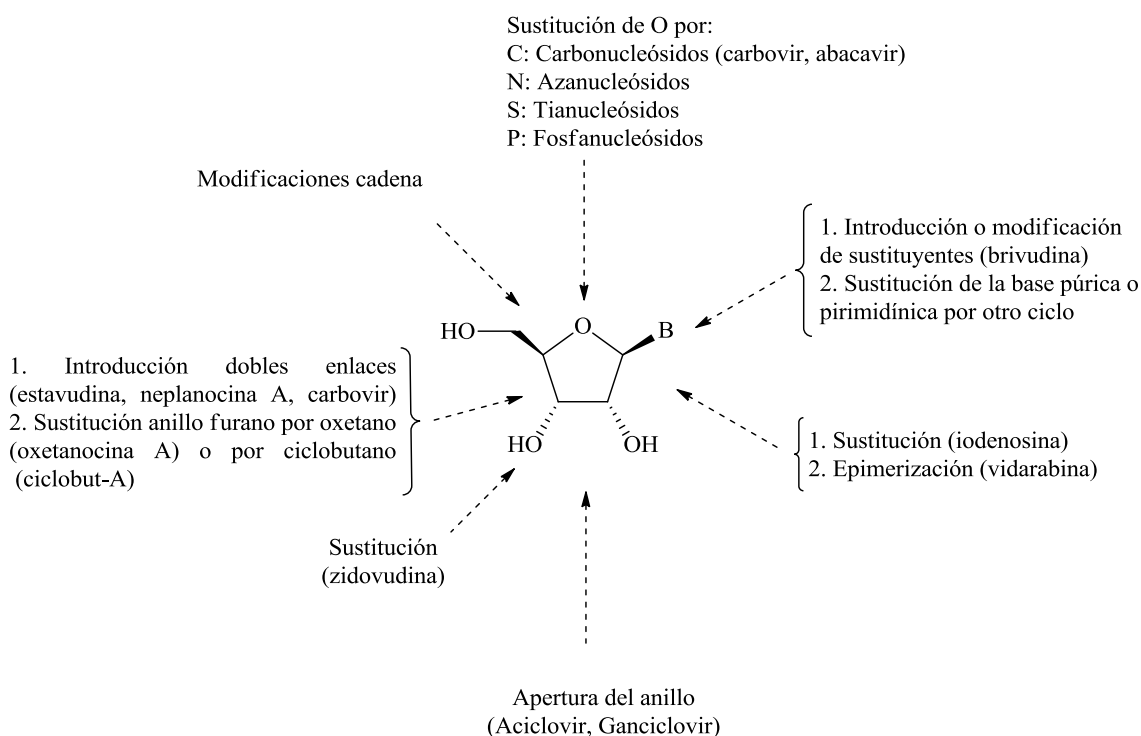
<sup>13</sup> (a) McCoss, M.; Robins, M. J. "Chemistry of Antitumour Agents", Ed. D.E.V. Wilman, Blackie and Son: U.K., p. 261 (1990). (b) Robins, R. K.; Kini, G. D. "Chemistry of Antitumour Agents", Ed. D.E.V. Wilman, Blackie and Son: U.K., p. 299 (1990).

<sup>14</sup> De Clercq, E. "Design of anti-AIDS Drugs", Ed. Elsevier, Pharmacotherapy Library, vol. 14 (1990).

<sup>15</sup> (a) Márquez, V. E.; Lim, M. *Med. Res. Rev.* **1986**, 6, 1. (b) Robins, R. K.; Revankar, G. R. "In Antiviral Drug Development", Eds. E. de Clercq, R. T. Walker, Plenum: New York, p. 11 (1988). (c) Ichiwaka, E.; Kato, K. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8 (4), 385.

hospedadora o entre la célula normal y la célula maligna, con la finalidad de evitar la aparición de efectos secundarios citotóxicos que pudieran acarrear graves efectos secundarios al paciente.

Los análogos de nucleósidos son el resultado de diversas modificaciones realizadas sobre las estructuras de los nucleósidos naturales, siendo las modificaciones más frecuentes las indicadas en la **figura 3**,<sup>16</sup> resultando especialmente interesantes las realizadas sobre la parte del azúcar, en las que éste ha sido sustituido por fragmentos estructurales que guardan relación química con la parte del azúcar de los nucleósidos naturales.



**Figura 3**

Desde el punto de vista de su estructura química, los análogos de nucleósidos se clasifican en nucleósidos convencionales (D-nucleósidos con modificaciones menores en el azúcar y/o base heterocíclica respecto a los nucleósidos naturales), C-nucleósidos (con enlace entre el carbono anomérico del azúcar y un carbono de la base), nucleósidos modificados en la base heterocíclica (denominados también como nucleósidos portadores de “bases atípicas”), nucleósidos modificados en el anillo del azúcar: que a su vez se dividen según el átomo que reemplaza al oxígeno del azúcar en carbanucleósidos (C), azanucleósidos (N), tianucleósidos (S) y fosfanucleósidos (P), nucleósidos inversos (L-nucleósidos) y nucleósidos acíclicos.

<sup>16</sup> Avendaño, C. *Introducción a la Química Farmacéutica*, 2ª Ed, McGraw-Hill-Interamericana, 2001, 239p.

En esta memoria definimos como *Análogos Carbacíclicos de Nucleósidos* (ACN)<sup>17</sup> o *Carbanucleósidos* a los compuestos que constan de una base púrica o pirimidínica más o menos modificada respecto a las naturales y unida directa o indirectamente a un carbociclo con funcionalidad análoga a las del azúcar de los nucleósidos clásicos.

De todas las posibles modificaciones que pueden realizarse sobre un nucleósido natural, nuestro grupo de investigación ha centrado sus esfuerzos, en los últimos años, en la preparación de ACN.

### 1.2.2. Análogos de nucleósidos como antivirales

Los virus son parásitos intracelulares obligados que necesitan la maquinaria bioquímica de la célula hospedadora para su replicación. Es por este motivo por el que no es fácil el diseño de fármacos que actúen selectivamente sobre el material vírico.

En general, las terapias antivíricas se basan en emplear las diferencias enzimáticas existentes entre las células hospedadoras y los virus, buscando una toxicidad selectiva sobre estos últimos.

De este modo las principales dianas de los análogos de nucleósidos en la terapia vírica son los elementos de replicación del genoma vírico y la síntesis de proteínas víricas en el medio intracelular. Normalmente para efectuar su acción, estos compuestos deben ser fosforilados por las *quinasas* víricas o celulares a sus formas activas trifosforiladas.

Desde el reconocimiento del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) como el agente causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la investigación sobre agentes antivíricos ha recibido un fuerte impulso, siendo sus frutos no sólo el descubrimiento y desarrollo de los propios agentes anti-VIH, sino también, como beneficios colaterales, el hallazgo de otros agentes activos frente a otros virus.

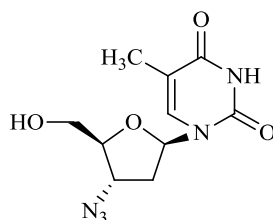
En el año 2010 se han cumplido 25 años desde el descubrimiento y desarrollo de los primeros fármacos antirretrovirales. En 1987 fue aprobado por la FDA el primer fármaco para el tratamiento del SIDA, la **azidotimidina (AZT)**,<sup>18</sup> con lo que los análogos de nucleósidos han vuelto a ser investigados con renovada intensidad, tanto en la búsqueda de agentes efectivos frente al SIDA, como de un tratamiento más eficaz para otras infecciones virales que pueden resultar letales en pacientes con SIDA y otros individuos inmunodeprimidos.

---

<sup>17</sup> Isono, K. *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1711.

<sup>18</sup> Broder, S. *Sci. Transl. Med.* **2010**, *2* (39), 33.

Esto ha traído como consecuencia una explosión de la actividad sintética en el terreno de los análogos de nucleósidos.



**azidotimidina**

La infección por VIH se debe a un retrovirus que infecta principalmente las células T del sistema inmune, ya que en su superficie poseen un receptor, llamada CD<sub>4</sub>, mediante el cual el virus penetra en la célula. La infección del VIH será una inmunodeficiencia progresiva como resultado de la persistente replicación vírica y la consecuente destrucción de los linfocitos CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, de forma que la supervivencia por un largo período libre de deficiencias inmunológicas, es excepcional.

Aunque existen hasta 11 posibles clases de agentes anti-VIH, clasificados en función de la etapa del ciclo viral sobre la que intervienen, sólo tres de éstas, la transcripción inversa del ARN proviral, la proteólisis de proteínas funcionales del VIH y la entrada del virus a la célula, son las dianas a las que están dirigidas la actual terapia anti-VIH.<sup>19</sup> Todos los fármacos aprobados para el tratamiento de infección por VIH pertenecen a una de las clases siguientes de compuestos: análogos de nucleósidos inhibidores de la *retrotranscriptasa* (*transcriptasa inversa*) (NRTIs), nucleótidos inhibidores de la *retrotranscriptasa* (NtRTIs), inhibidores no nucleósidos de la *retrotranscriptasa* (NNRTIs), inhibidores de la *proteasa vírica* (PIs) e inhibidores de la entrada del virus a la célula.<sup>20</sup>

Recientemente se ha desarrollado una nueva clase de fármacos inhibidores de la *integrasa* y en octubre de 2007, el **raltegravir**<sup>21</sup> ha sido el primero de los fármacos de esta clase aprobado por la FDA, al cual le ha seguido el **elvitegravir**.

Los inhibidores de la *integrasa* bloquean a esta enzima, que el VIH precisa para combinar el ADN viral, generado tras el proceso de transcripción inversa, con el ADN de la célula humana, y para el posterior proceso de síntesis de largas cadenas de proteínas. Sin embargo, el raltegravir es relativamente frágil al desarrollo de resistencias, por lo que se ha introducido un

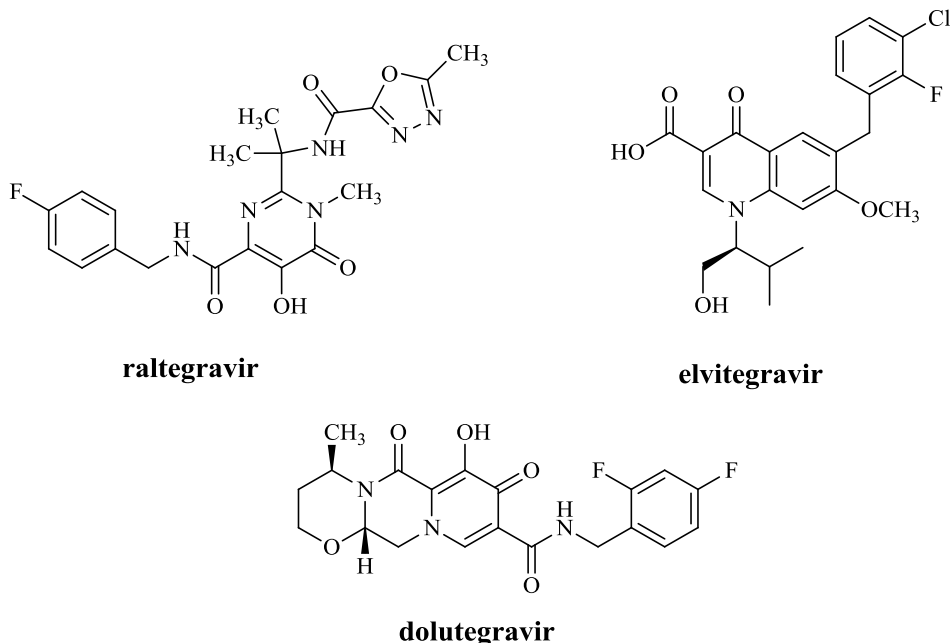
---

<sup>19</sup> De Clerq, E. *J. Clin. Virol.* **2004**, 30 (2), 115.

<sup>20</sup> Broder, S. *Antiviral Res.* **2010**, 85, 1.

<sup>21</sup> Cahn, P.; Sued, O. *Lancet* **2007**, 369, 1261.

inhibidor de la integrasa de segunda generación, el **dolutegravir** (S/GSK1349572), en avanzado desarrollo clínico.<sup>22</sup>



Inicialmente, para el tratamiento del SIDA se utilizó la monoterapia o bien combinaciones de dos fármacos, pero debido a la escasa eficacia por la rápida aparición de resistencias, actualmente los fármacos antirretrovirales se emplean habitualmente en combinaciones triples o cuádruples, que conducen a una importante supresión de la carga vírica y retrasan significativamente la aparición de síntomas de la enfermedad (**Trizivir®**: lamivudina + abacavir + azidotimidina;<sup>23</sup> **Atripla®**: emtricitabina + efavirenz + tenofovir, esta última combinación fue aprobada por lo EMEA en Junio de 2008).<sup>24</sup>

Los compuestos de tipo NRTI fueron los primeros que se utilizaron para tratar la infección del VIH, al no existir en las células humanas una enzima análoga a la *retrotranscriptasa* codificada por el VIH, de modo que ésta constituye una diana importante en la terapia anti-retrovírica. Se trata de análogos nucleosídicos que carecen del grupo OH en la posición 3', de modo que, una vez transformados en la forma trifosfato activa e incorporados a la cadena de ADN, actúan como terminadores de ésta. Se han utilizado con éxito diferentes grupos funcionales como sustitutos del OH.

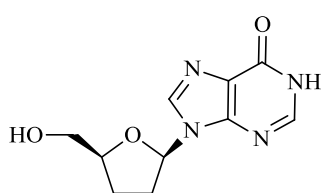
<sup>22</sup> Garrido, C.; Soriano, V.; Geretti, A. M.; Zahonero, N.; Garcia, S.; Booth, C.; Gutierrez, F.; Viciano, I.; De Mendoza, C. *Antiviral Res.* **2011**, *90* (3), 164.

<sup>23</sup> Mallolas, J.; Pich, J.; Penaranda, M.; Domingo, P.; Knobel, H.; Pedrol, E.; Gutierrez, F.; Barrufet, P.; Peraire, J.; Asenjo, M. A. *AIDS*, **2008**, *22* (3), 384.

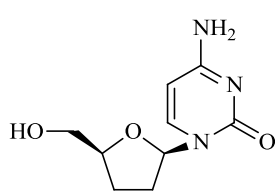
<sup>24</sup> Deeks, E. D.; Perry, C. M. *Drugs*, **2010**, *70* (17), 2315.

Como ya hemos indicado la azidotimidina (AZT), un análogo de la timidina que presenta un grupo azido en lugar del OH de la posición 3' de la ribosa, fue el primer fármaco aprobado para el tratamiento del SIDA.

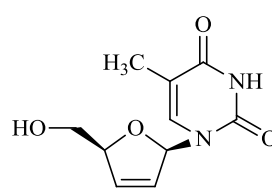
Posteriormente se aprobaron los didesoxinucleósidos **didesoxiinosina (didanosina, ddI)** y **didesoxicitidina (zalcitabina, ddC)**, seguidos de la **estavudina (d4T)**, un análogo nucleosídico portador de un doble enlace C2'-C3', y la **lamivudina (3TC)**, en la que el carbono de la posición 3' se reemplaza por un S. Entre los análogos de nucleósidos más recientes se encuentran el **abacavir** y el derivado fluorado de la lamivudina, **emtricitabina (FTC)**.<sup>25</sup>



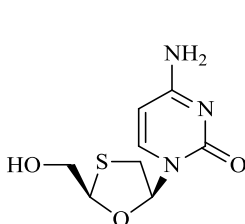
**didesoxiinosina**



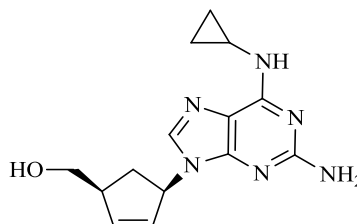
**didesoxicitidina**



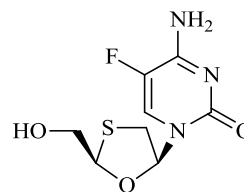
**estavudina**



**lamivudina**



**abacavir**



**emtricitabina**

La maduración viral y la consecuente capacidad de infección del VIH no se pueden lograr sin la acción de la *proteasa viral*.

El descubrimiento y desarrollo de fármacos inhibidores de la *proteasa*, permitió contar con un nuevo arsenal de compuestos y ensombreció el desarrollo de nuevos inhibidores de la *retrotranscriptasa*, ya que mostraron mayor eficacia anti-retrovírica y una mayor disminución de la carga viral que los mostrados por los inhibidores de la *retrotranscriptasa*.

Algunos ejemplos de este grupo son: **saquinavir**, **ritonavir**, **indinavir**, **nelfinavir**, **amprenavir**, **lopinavir**, **atazanavir** y **tripanavir**.<sup>19</sup>

<sup>25</sup> Vivet-Boudou, V; Didierjean, J.; Isel, C.; Marquet, R. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63, 163.

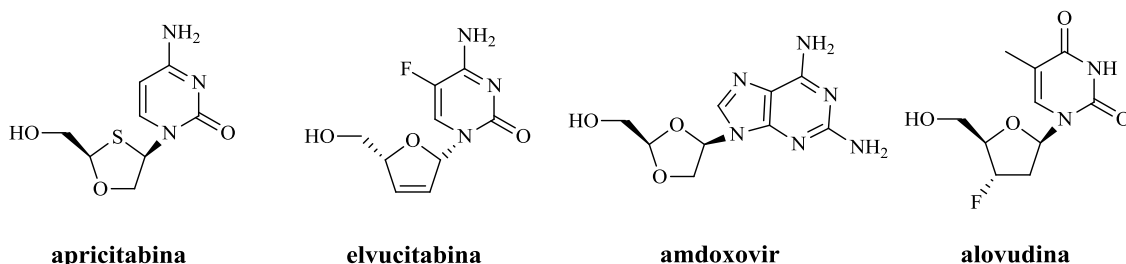
Sin embargo, con el descubrimiento del abacavir,<sup>26,27,28,29</sup> el cual presenta un perfil biológico único y de potente actividad anti-retrovírica, se vio nuevamente impulsado el interés por el grupo de fármacos tipo NRTIs.

Además la activación intracelular que sufre le permite superar las deficiencias farmacológicas y toxicológicas de los compuestos pertenecientes a este grupo, haciendo que el abacavir se pueda definir como el precursor de una segunda generación de NRTIs, siendo a su vez el inhibidor más potente descrito hasta el momento.

Aunque los NRTIs pueden disminuir los niveles de ARN vírico en plasma hasta una cantidad casi indetectable, la toxicidad a nivel mitocondrial y/o la aparición de mutaciones resistentes en el virus, representa un inconveniente para la utilización de este tipo de fármacos,<sup>30,31</sup>

Por este motivo, un objetivo prioritario en el diseño de moléculas de este tipo, es el desarrollo de nuevos inhibidores de la RT con un mecanismo de acción alternativo y que muestren diferentes perfiles de resistencia.

Fruto de estas investigaciones ha sido el desarrollo de diversos análogos que se encuentran actualmente en diferentes fases de ensayo clínico, como es el caso de **apricitabina (ATC)**, **elvucitabina (L-d4FC)**, **amdoxovir (DAPD)**, **alovudina (FLT)**.<sup>32</sup>



A estos, le siguieron otros compuestos como es el caso del **D-dioxolanotimidina (DOT)** y del **D-dioxolano-5-fluorocitidina (FDOC)**, con un interesante perfil de actividad antiviral

<sup>26</sup> Crimmins, M. T.; King, B. W. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4192.

<sup>27</sup> Gaul, A.; Lesson, P.A.; Castañer, J. *Drugs of the future*, **1998**, *23* (11), 1155 y referencias allí citadas.

<sup>28</sup> Faletto, M. B.; Miller, W. H.; Garvey, E. P.; St. Clair, M. H.; Daluge, S. M.; Good, S. S. *Antimicrobs Agents Chemother.* **1997**, *42*, 1099.

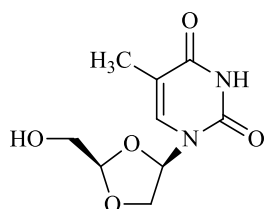
<sup>29</sup> Daluge, S. M.; Good, S. S.; Faletto, M. B.; Miller, W. H.; Wayne, H.; Martin, M. T.; St. Clair, M. H.; Boone, L. R.; Tisdale, M.; Parry, N. R.; Reardon, J. E.; Dornsife, R. E.; Averett, D. R.; Devron, R.; Krenitsky, A. T. *Antimicrobs Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1082.

<sup>30</sup> Cossarizza, A.; Moyle, G. *AIDS* **2004**, *18*, 37.

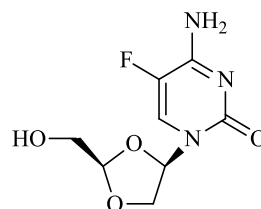
<sup>31</sup> Gallart, J.; Gerondellis, P. Z.; Wainberg, M.A.; Shulman, N.S.; Haubrich, R.H.; St. Clair, M.; Lanier, E.R.; Hellmann, N. S.; Richman, D.D. *Antiviral Ther.* **2003**, *8*, 489.

<sup>32</sup> Cihlar, T.; Ray, A. S. *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 39.

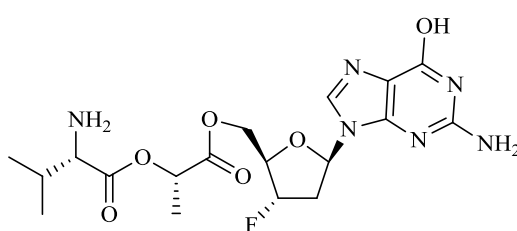
debido a la presencia del anillo de dioxano,<sup>33</sup> el **lagociclovir (MIV-210)** y el **KP1461**, precursor del **KP1212**.<sup>32</sup>



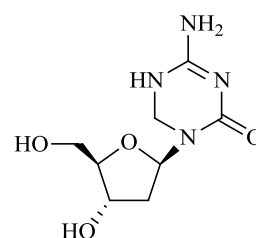
**DOT**



**FDOC**

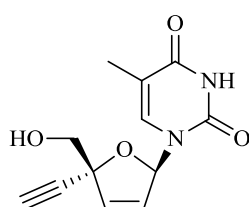


**lagociclovir**

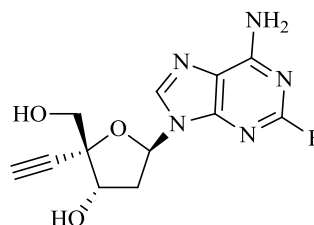


**KP-1212**

En la actualidad se está desarrollando una nueva clase de NRTIs, los 4'-etilnucleósidos, donde podemos destacar el **festinavir (4'-Ed4T)** y el **2'-deoxi-4'-C-etil-2-fluoroadenosina (EFdA)**, ambos en diferentes fase de desarrollo.<sup>32</sup>



**festinavir (4'-Ed4T)**



**EfdA**

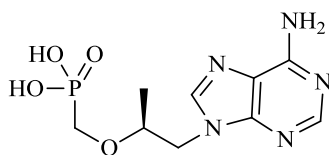
Los NtRTIs son similares a los NRTIs en cuanto a su mecanismo de acción pero ya contienen un grupo fosfato de modo que, una vez dentro de la célula, sólo requieren dos fosforilaciones en lugar de las tres que necesitan los nucleósidos para ser activos. Se ha comprobado que los NRTIs/NtRTIs son componentes indispensables en la quimioterapia del VIH, ya que actualmente todos los tratamientos contienen unos o más fármacos de alguna de estas dos clases.<sup>34</sup> Dentro de los NtRTIs cabe destacar el **tenofovir (TNF)**.<sup>35</sup>

<sup>33</sup> Chu, C.;Yadav, V.; Chong, Y.; Schinazi, R. J. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3949.

<sup>34</sup> Meadows, D. C.; Guervay-Hague, J. *Chem Med Chem.* **2006**, *1*, 16.

<sup>35</sup> Bozal, B.; Uslu, B.; Ozkan, S. A. *Int. J. Electrochem.* **2011**, 17.





**tenofovir**

### 1.2.3. Análogos de nucleósidos como anticancerígenos

A pesar de la limitación que supone la dificultad de encontrar fármacos selectivos que no afecten a las células sanas, la quimioterapia del cáncer ha progresado espectacularmente desde su introducción en los años cuarenta, fundamentalmente en los tumores de origen hematopoyético (leucemias y linfomas).

Esta situación se debe en cierta medida a que durante años se utilizaron como modelos para el ensayo de la actividad citotóxica líneas celulares de leucemias linfocíticas (especialmente P388 y L1210). En consecuencia, los agentes que se mostraron activos en estos modelos lo fueron finalmente frente a neoplasias similares.

La quimioterapia se enfrenta también con el problema de la quimiorresistencia adquirida que se origina en determinados tumores tras varios ciclos de tratamiento.

Estas resistencias se superan en parte combinando varios tipos de agentes citotóxicos permitiendo actuar sobre diferentes partes del proceso metabólico de las células, incrementado la posibilidad de que puedan morir muchas más células cancerosas.

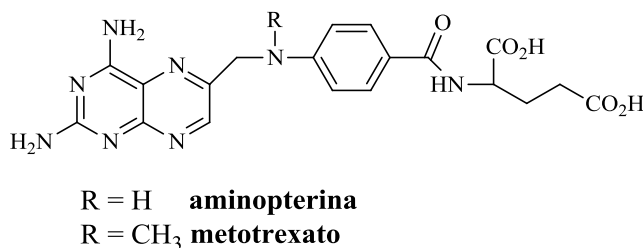
En la actualidad está en estudio la posible asociación de compuestos antitumorales con otros fármacos que reviertan los mecanismos por los que se producen las resistencias.

El modelo terapéutico clásico para impedir la proliferación de células cancerosas se basa en estrategias que evitan que estas células repliquen su ADN. La explotación de nuevos conocimientos sobre mecanismos bioquímicos en los que intervienen desoxinucleótidos ha llevado al desarrollo de grupos de fármacos usados como antimetabolitos, que constituyen una clase importante de compuestos con actividad terapéutica en el tratamiento del cáncer y cuya acción última consiste en interferir en la síntesis del ADN.

Los pasos iniciales en la terapia antineoplásica se realizaron en el tratamiento de la leucemia linfocítica.

En 1948, el equipo de Sidney Farber, del hospital infantil de Boston,<sup>36</sup> anunció que el tratamiento con **aminopterina**, un antagonista del ácido fólico, había tenido como resultado la remisión temporal en varios casos de leucemia infantil.

Aunque estas remisiones eran poco comunes y breves, suponían un adelanto esperanzador y el principio había quedado establecido: los antimetabolitos podían suprimir la proliferación de células malignas, y podían, de esta forma, restablecer el funcionamiento normal de la médula ósea. En el periodo de un año se desarrolló otra variante del ácido fólico denominada **metotrexato**. Este metabolito se convirtió en uno de los pilares de la quimioterapia contra la leucemia.



Otro grupo de investigación que dio un gran impulso al desarrollo de antimetabolitos fue el equipo de George Hitchings y Gertrude Elion desarrollando la **6-mercaptopurina (6-MP)**,<sup>37</sup> la cual causó un gran impacto, siendo aprobado su uso en clínica en el año 1953, 10 meses después de que se iniciaran los ensayos clínicos.

Entre los metabolitos más importantes usados en clínica con actividad sobre cánceres hematopoyéticos caben citar bases modificadas como la 6-mercaptopurina, citada anteriormente y la **tioguanina**. Como análogos de nucleósidos podemos citar la **citarabina (Ara-C)**.<sup>38</sup>

La citarabina es uno de los fármacos más estudiados en la terapia del cáncer, sus propiedades citotóxicas derivan del resto de arabinosa, siendo metabolizada mediante las rutas de la desoxicitidina y sus nucleótidos. Su actividad ha llevado a la síntesis y evaluación de otros derivados de arabinosa surgiendo así un grupo de arabinosilderivados entre los que sobresale por su actividad antineoplásica la **fludarabina**<sup>39</sup> en la que la introducción de un átomo de flúor en el carbono 2 del anillo de adenina provoca cambios electrónicos que hacen al grupo amino resistente al proceso de desaminación e hidrólisis.

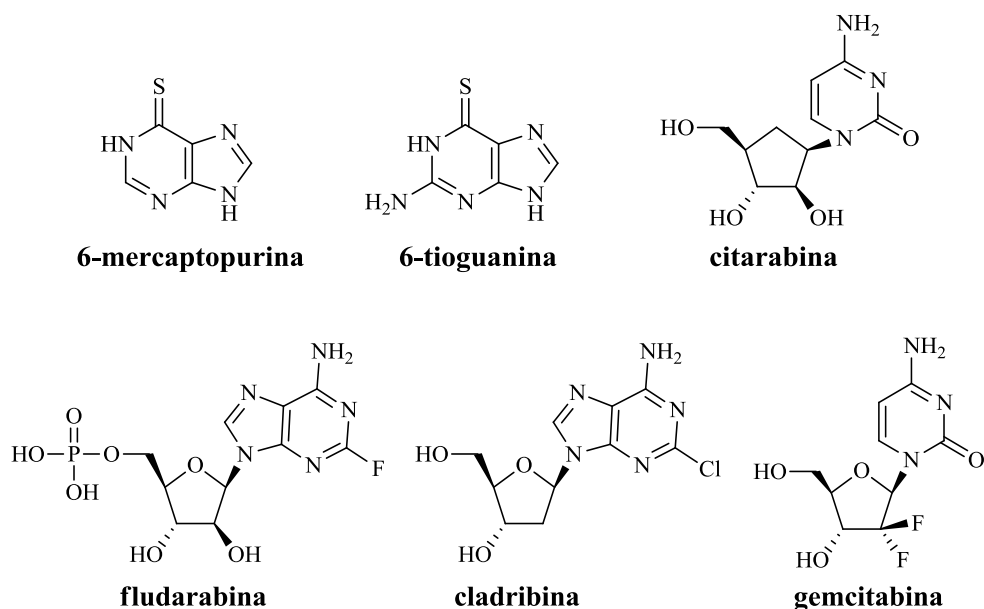
<sup>36</sup> Farber, S.; Diamond, L. K.; Mercer, R. D.; Sylvester, R. F.; Wolff, J. A. *N. Engl. J. Med.* **1948**, 238, 787.

<sup>37</sup> Elion, G. B.; *Toxicol. Ind. Health* **1986**, 2, 1.

<sup>38</sup> Chabner, B.A. *Cytidine Analogues in Cancer Chemotherapy: Principles and Practice*, 2<sup>nd</sup> ed. B.A. Chabner, D. L. Longo. Eds. J. B. Lippincott Co., Philadelphia **1995**.

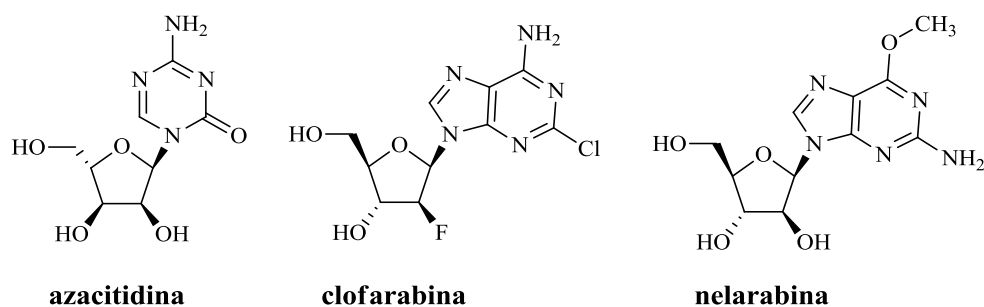
<sup>39</sup> Plunket, W.; Huang, P.; Gandhi, V. *Semin. Oncol.* **1990**, 17, 3.

Análogas propiedades son conferidas por el átomo de cloro en la **cladribina**<sup>40</sup> y por los dos átomos de flúor germinales en el carbono 2' en el caso de la **gemcitabina**,<sup>41</sup> con la diferencia de que esta última resulta eficaz para el tratamiento de diversos tumores sólidos.



Dentro de los últimos análogos de nucleósidos aprobados por FDA para el tratamiento del cáncer cabe destacar: la **azacitidina**, la **clofarabina**, la **nelarabina** y la **decitabina**.

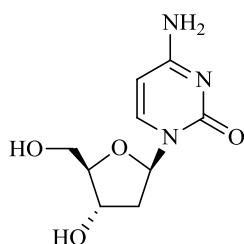
Por último, mencionaremos la **tiarabina** (4'-tio-β-D-arabinofuranosil-citosina, 4'-tio-**ara-C**) que presenta una estructura muy similar a la de ara-C donde el átomo de oxígeno del anillo de ara-C es sustituido por un átomo de azufre.<sup>42</sup>



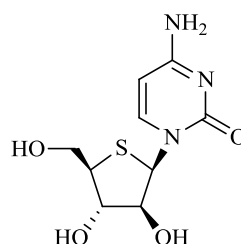
<sup>40</sup> (a) Piro, L. D.; Carrera, C. J.; Beutler, E.; Carson, D.A. *Blood* **1988**, 72, 1069. (b) Mitterbaner, M.; Hilgenfeld, E.; Wilfing, A.; Jager, U.; Knauf, W. U. *Leukemia* **1997**, 11, S35.

<sup>41</sup> (a) Plunket, W.; Huang, P.; Xu, Y. Z.; Heinemann, V. Grunewald, R.; Gandhi, V. *Semin. Oncol.* **1995**, 22, 3. (b) Casper, E. S.; Green, M. R.; Kelsen, D. P.; Heelan, R. T.; Brown, T. D.; Flombaum, C. D.; Trochanoeski, B.; Tarasoff, P. G. *Invest. New Drugs* **1994**, 12, 29.

<sup>42</sup> Robak, T. *Exp. Op. Invest. Drugs* **2011**, 20 (3), 343.



**decitabina**



**6'-tio-ara-C**

Los análogos de nucleósidos continúan siendo un objetivo importante en la investigación contra el cáncer a pesar de que no se conocen bien sus mecanismos de acción.

La selectividad y eficacia clínica de ciertos análogos, así como el descubrimiento de los mecanismos de acción de enzimas relevantes como la *desoxicitidinoquinasa* y las *ADN-polimerasas*, han permitido aplicar el diseño racional al desarrollo de nuevos nucleósidos dotados de potencial actividad anticancerígena.

### 1.3. CARBANUCLEÓSIDOS

#### 1.3.1. Origen y desarrollo

Uno de los descubrimientos más importantes dentro del campo de los análogos de nucleósidos ha sido el desarrollo de los Análogos Carbacíclicos de Nucleósidos (ACN) o Carbanucleósidos.<sup>17,43,44</sup>

Estos compuestos surgen por una modificación estructural sobre los nucleósidos naturales en los cuales el átomo de oxígeno glicosídico del ciclo de furanosa ha sido reemplazado por un átomo de carbono.

Desde el punto de vista químico conviene destacar que, debido a la presencia de un enlace carbono-nitrógeno en lugar del enlace *N*-glicosídico clásico de los nucleósidos naturales, los ACN presentan mayor estabilidad química y metabólica, por lo que serán más resistentes a las hidrolasas.

Además, dada su similitud estructural, pueden ser sustratos de los enzimas que los fosforilan y los hacen activos para poder integrarse en las cadenas de ADN y ARN, inhibiendo así la replicación del genoma vírico o cancerígeno, o bien actuando como inhibidores suicidas de enzimas que intervienen en el metabolismo de nucleósidos.

---

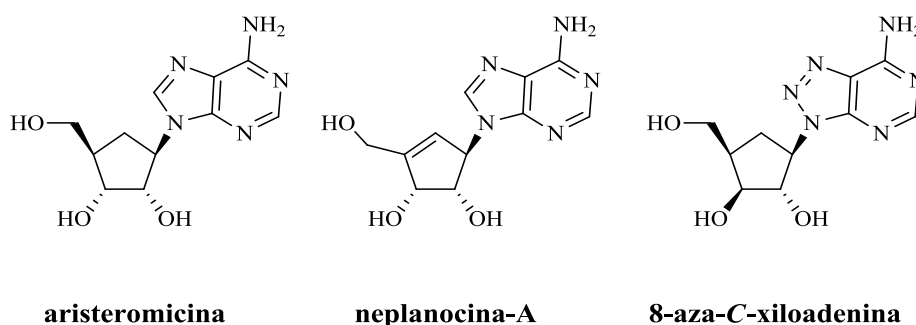
<sup>43</sup> Schneller, S. W. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, 2 (10), 1087.

<sup>44</sup> Jeong, L. S.; Lee, J. A. *Antiviral Chem. Chemother.* **2004**, 15 (5), 235.

Aunque la mayoría de los ACN son de origen sintético, cabe destacar el aislamiento de ACN de fuentes naturales, como la **aristeromicina**<sup>45,46</sup> que fue aislada en forma del enantiómero (-) como un metabolito de *Streptomyces citricolor*.

Posteriormente se aislaron diversos carbanucleósidos del grupo de las neplanocinas<sup>47,48,49</sup> de la *Ampullariella regularis*, particularmente la **neplanocina A**, lo que condujo a la síntesis de compuestos de interesante actividad biológica dentro del grupo de los ACN antivirales y antineoplásicos.

La sustitución sistemática por el carbociclo en la series de la ribosa, desoxirribosa, arabinosa y xilosa de nucleósidos antitumorales selectivos conduce, en general, a una disminución de dichas propiedades, excepto en algunos casos como en el **8-aza-C-xiloadenina**.<sup>50,51,\*</sup>



Dentro de estos compuestos también cabe destacar la **C-ara-adenosina**<sup>52</sup> y la **3-desaza-C-adenosina**,<sup>53</sup> como derivados púricos, y la **5-yodo-C-desoxiuridina**,<sup>54</sup> como derivado pirimidínico, como un ejemplo de fármacos que ocupan un lugar destacado en la quimioterapia antivírica.

<sup>45</sup> Kusaka, T.; Yamamoto, H.; Shibata, M.; Muroi, M.; Kishi, T.; Mizuno, K. *J. Antibiot.* **1968**, *21*, 255.

<sup>46</sup> Kishi, T.; Muroi, M.; Kusaka, T.; Nishikawa, M.; Kamiya, K.; Mizuno, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1972**, *20*, 940.

<sup>47</sup> Yaginuma, S.; Muto, N.; Tsujino, M.; Hayashi, M.; Sudate, Y.; Otani, M. *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 539.

<sup>48</sup> Yaginuma, S.; Tsujino, M.; Muto, N.; Otani, M.; Hayashi, M.; Ishimura, F.; Fujii, T.; Watanabe, S.; Matsuda, T.; Watanabe, T.; Abe, J. *Curr. Chemother. Infect. Dis., Int. Congr.* **1980**, *2*, 1558.

<sup>49</sup> Tosh, D. K.; Kim, H. O.; Pal, S.; Lee, J. A.; Jeong, L. S. *Modified Nucleosides* **2008**, 525.

<sup>50</sup> Shealy, Y. F.; Clayton, J. D. *J. Pharm. Sci.* **1973**, *62*, 1252.

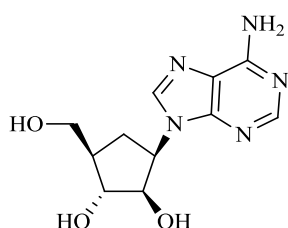
<sup>51</sup> Shealy, Y. F.; Clayton, J. D.; O'Dell, C. A. *J. Heterocycl. Chem.* **1973**, *10*, 601.

\* Además del uso ordinario de la nomenclatura sistemática, ha sido frecuente designar estos compuestos mediante el nombre vulgar o semisistemático del correspondiente nucleósido precedido de la letra C (en cursiva). Aunque todavía en uso, esta práctica, sin embargo no se ha generalizado por la confusión que introduce respecto a los tradicionales C-nucleósidos.

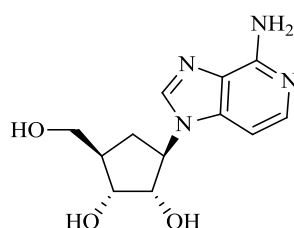
<sup>52</sup> (a) Vince, R.; Daluge, S. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 612. (b) Daluge, S.; Vince, R. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2311.

<sup>53</sup> Montgomery, J. A.; Clayton, S. J.; Thomas, H. J.; Shannon, W. M.; Arnett, G.; Bodner, A. J.; Kion, I. K.; Cantoni, J. L.; Chiang, P. K. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 626.

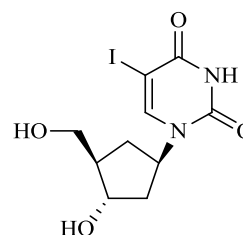
<sup>54</sup> Lin, T.; Zhang, X.; Wang, Z.; Prusoff, H. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 484.



**C-ara-adenosina**

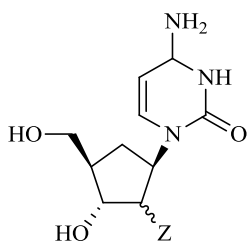


**3-desaza-C-adenosina**



**5-yodo-C-desoxiuridina**

También se han sintetizado ACN con actividad antivírica, cuya estructura se corresponde con las C-2'-desoxicitidinas, **1**,<sup>55</sup> activos frente a los virus VHS-1 y VHS-2, *in vitro*, derivados de la neplanocina A, **2**, derivados de la C-uridina, **3**,<sup>56</sup> activos frente al VHS-1 y VHS-2, *in vivo*.

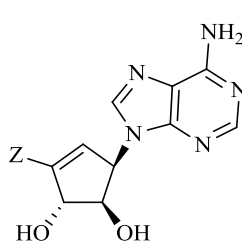


**1a:** Z = NH<sub>2</sub> (C-2'S)

**1b:** Z = N<sub>3</sub> (C-2'S)

**1c:** Z = F (C-2'R)

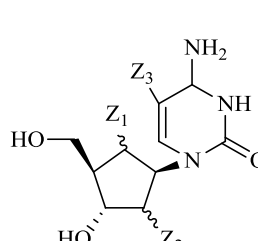
**1d:** Z = F (C-2'S)



**2a:** Z = alquilo

**2b:** Z = CH<sub>2</sub>OR

**2c:** Z = CH(OH)R



**3a:** Z<sub>1</sub> = Z<sub>3</sub> = H; Z<sub>2</sub> = F (C-2'R)

**3b:** Z<sub>1</sub> = Z<sub>3</sub> = H; Z<sub>2</sub> = F (C-2'S)

**3c:** Z<sub>1</sub> = H; Z<sub>3</sub> = R; Z<sub>2</sub> = F (C-2'S)

**3d:** Z<sub>1</sub> = H; Z<sub>3</sub> = I; Z<sub>2</sub> = F (C-2'R)

**3e:** Z<sub>1</sub> = F(C-6'R); Z<sub>3</sub> = I; Z<sub>2</sub> = H

**3f:** Z<sub>1</sub> = F(C-6'S); Z<sub>3</sub> = I; Z<sub>2</sub> = H

**3g:** Z<sub>1</sub> = F(C-6'R); Z<sub>3</sub> = Z<sub>2</sub> = H

**3h:** Z<sub>1</sub> = F(C-6'S); Z<sub>3</sub> = Z<sub>2</sub> = H

El abacavir, mencionado anteriormente como el inhibidor de la RT más potente descrito hasta el momento, se trata de un análogo ciclopropilamínico del (-)-**carbovir**, un potente y selectivo inhibidor *in vitro* del VIH-1.<sup>57,58</sup>

El abacavir presenta una mayor biodisponibilidad por vía oral que su análogo existiendo diferentes estudios preclínicos que demostraron la favorable penetración del abacavir en el

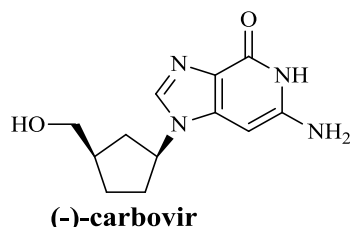
<sup>55</sup> (a) Borthwick, A. D.; Evans, D. N.; Kirk, B. E.; Biggadike, K.; Exall, A. M.; Youds, P.; Roberts, S. M.; Knight, D. J.; Coats, J. A. V. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 179. (b) Biggadike, K.; Borthwick, A. D.; Exall, A. M.; Kirk, B. E.; Roberts, S. M.; Youds, P.; Slawin, A. M. Z.; Williams, D. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 255.

<sup>56</sup> Shuto, S.; Obara, T.; Toriya, M.; Hosoya, M.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; De Clercq, J. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 324.

<sup>57</sup> (a) Taylor, S. J. C.; Sutherland, A. G.; Lee, C.; Wisdom, R.; Thomas, S.; Roberts, M.; Evans, C. *J. Chem. Soc., Chem Commun.* **1990**, 1120. (b) Vince, R.; Hua, M. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 17.

<sup>58</sup> Brown, B.; Hegedus, L. S.; *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (6), 1865.

cerebro y en el sistema nervioso central, los cuales resultan ser importantes reservorios de la replicación viral.<sup>59</sup>



Este compuesto surgió en un intento de incrementar la biodisponibilidad oral del carbovir y maximizar de esta forma la actividad anti-VIH, resultando ésta equivalente o superior a la del AZT, y siendo la penetración en el cerebro y médula espinal (lugares reservorio del virus)<sup>60,61,62</sup> tan buena como la de la AZT.

De este modo, la activación intracelular del abacavir le permitió superar las deficiencias farmacológicas y toxicológicas de otros nucleósidos inhibidores de la RT (NRTIs).

Actualmente se está trabajando con intensidad en la síntesis y estudio de ACN sustituidos o modificados en distintas posiciones del anillo carbocíclico, así dentro de los derivados sustituidos (C-1')<sup>63</sup> destaca la **psicoplanocina A** como un potente agente antitumoral y antibacteriano.

Dentro de los derivados sustituidos (C-4')<sup>64</sup> cabe destacar el **2'β, 4'-α -difluoro-ara-C-guanosina, 4a**, por su potente actividad contra el virus VHS-1 y VHS-2, así como su análogo, **4b**.<sup>65</sup>

En el grupo de los derivados (C-6') se encuentran una gran variedad de compuestos ACN, como los **6'-azido-** y **6'-fluro-carbanucleósidos, 5**,<sup>66</sup> preparados como análogos modificados de la azidotimidina con potencial actividad antivírica en el tratamiento del SIDA.

<sup>59</sup> Daluge, S. M.; Good, S. S.; Falletto, M. B.; Miller, W. H.; St. Clair, M. H.; Boone, L. R.; Tisdale, M.; Parry, N. R.; Reardon, J. E.; Dornsife, R. E.; Averett, D. R.; Krenitsky, T. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41* (5), 1082.

<sup>60</sup> Thomas, S.; McDowall, J. E.; Cheah, V.; Bye, A.; Segal, M. B. *The entry of 1592U89 (Abacavir) into the guinea-pig brain: Comparison with other reverse transcriptase inhibitors*, 12<sup>th</sup> World AIDS Conf., Geneva (Suiza), 28 de Junio-3 de Julio de **1998**.

<sup>61</sup> Ravitch, J. R.; Jarret, J. L.; White, H. R.; Polli, J. W.; Humphreys, E.; Good, S. S.; *CNS penetration of the anti-retroviral of 1592U89 (Abacavir) in human and animal model*, 5<sup>th</sup> Conf. Retroviruses Opportunistic Infect., Chicago (USA), 1-3 de Febrero de **1998**.

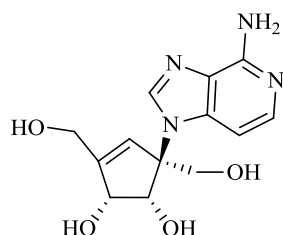
<sup>62</sup> Bodenteich, M.; Márquez, V. E. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5977.

<sup>63</sup> Bodenteich, M.; Márquez V. E.; Barchi, Hallows, W. H.; Goldstein, B. M.; Driscoll, J. S. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6009.

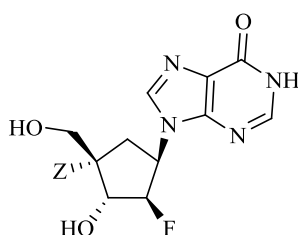
<sup>64</sup> Coe, D. M.; Myers, P. L.; Parry, D. M.; Roberts, S. M.; Storer, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 151.

<sup>65</sup> (a) Levitt, M. L.; Newton, R. F.; Roberts, S. M.; Willetts, A. J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 619. (b) Highcock, R. M.; Hilpert, H.; Myers, P. L.; Roberts, S. M.; Storer, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1991**, 112.

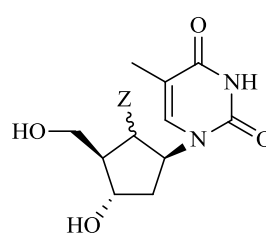
<sup>66</sup> Cheikh, A. B.; Craine, L. E.; Recher, S. G.; Zemlicka, J. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 929.



**psicoplanocina A**

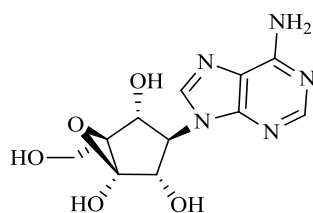


**4a: Z = F**  
**4b: Z = H**

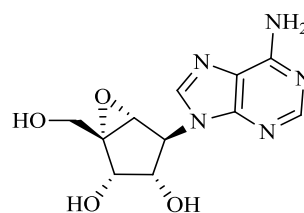


**5a: Z = N<sub>3</sub> (C-6'R)**  
**5b: Z = N<sub>3</sub> (C-6'S)**  
**5c: Z = F (C-6'R)**  
**5d: Z = F (C-6'S)**

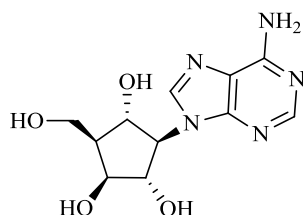
También cabe destacar entre este tipo de derivados, diversos hidroxiepóxidos pertenecientes a la familia de las neplanocinas, **6**,<sup>67</sup> como son la **neplanocina B** y la **C**, así como algunos carbanucleósidos polihidroxilados, **7**, derivados de la aristeromicina, todos ellos con potenciales actividades antibióticas y antivíricas.



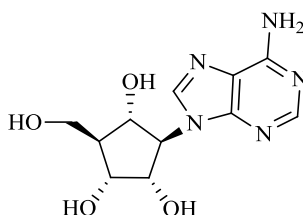
**6a**  
**neplanocina B**



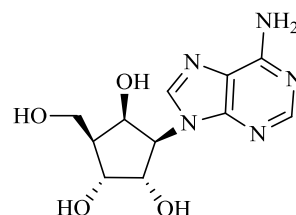
**6b**  
**neplanocina C**



**7a**



**7b**



**7c**

Otro grupo de sustancias de interés en este campo son los denominados aciclo-carbanucleósidos o análogos acíclicos, **8**, como por ejemplo el **aciclovir**,<sup>68,69</sup> el **penciclovir**<sup>70</sup> y su profármaco el **famciclovir** que se utilizan en el tratamiento del VHS, VVZ y hepatitis B

<sup>67</sup> Rodríguez, S.; Edmont, D.; Mathe C.; Perigaud, C. *Tetrahedron* **2007**, 63, 7165.

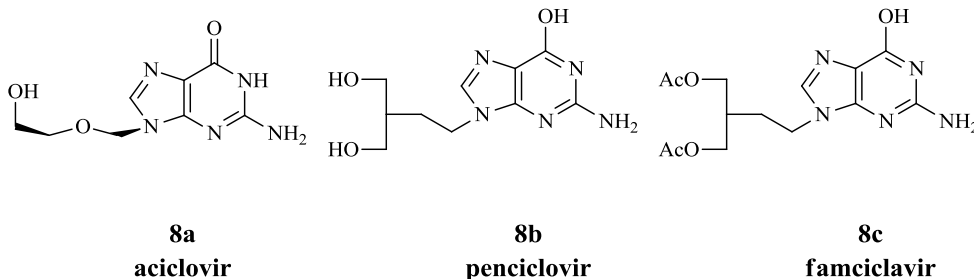
<sup>68</sup> Hasobe, M.; McKee, J. E.; Keller, B. T.; Borchardt, R. T. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 1729.

<sup>69</sup> Ashton, T.; Meurer, L. C.; Cantone, C. L.; Field, A. K.; Hannah, J.; Karkas, J. D.; Lion, R.; Patel, G. F.; Perry, H. C.; Wagner, A. F.; Walton, E.; Tolman, R. L.; *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 2304.

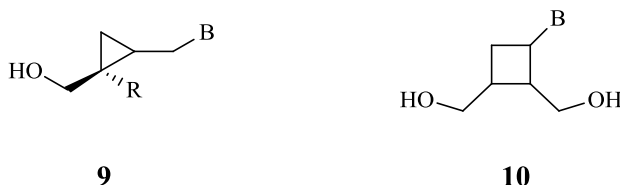
<sup>70</sup> (a) Boyd, M. R.; Bacon, T. H.; Sutton, D.; Cole, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, 31(8), 1238. (b) Lowe, D. M.; Alderton, W. K.; Ellis, M. R.; Parmar, V.; Miller, W. H.; Roberts, G. B.; Fyfe, J. A.; Gaillard, R.; Ertl, P.; et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39(8), 1802.



humana. Estos dos derivados logran equivalencias en la biodisponibilidad oral respecto al aciclovir.



También son de interés los “ciclopropano-carbanucleósidos”, **9** y los “ciclobutano-carbanucleósidos”, **10**.<sup>71</sup>



Hay que destacar que la conformación de los nucleósidos juega un papel importante en la modulación de sus propiedades biológicas.

Tomando como base que la pérdida del oxígeno en los carbanucleósidos provoca que el anillo de ciclopentano adopte conformaciones diferentes de las típicas conformaciones Norte y Sur de los nucleósidos clásicos,<sup>72</sup> se ha diseñado una serie de 2',3'-exometil-carbanucleósidos conformacionalmente equivalentes.

Esta serie de compuestos se han sintetizado a partir de un sistema biciclo [3.1.0]hexano, originando carbanucleósidos rígidos como **11**.<sup>73,74</sup> A su vez el anillo de ciclopropano le confiere propiedades conformacionales análogas a la presencia de un sistema insaturado de dobles enlaces carbono-carbono.

De ahí, las expectativas de poder obtener compuestos con propiedades antivirales<sup>75</sup> como los derivados **11a y 11b** que mostraron actividad antiherpética similares al aciclovir.<sup>76</sup>

<sup>71</sup> Boumchita, M.; Legraverend, A.; Zerial, M.; Lemaitre, C.; Huel, E.; Bisagni, E. *Eur. J. Med. Chem.* **1991**, 26, 613.

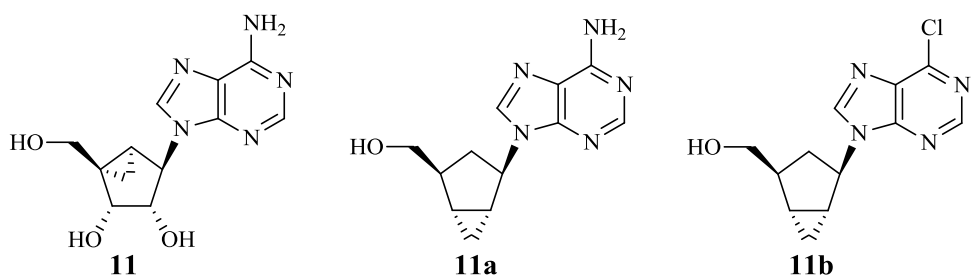
<sup>72</sup> Shin, K. J.; Moon, H. R.; George, C.; Márquez, V. E. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 2172.

<sup>73</sup> Márquez, V. E. *Adv. Antiviral Drug Des.* **1996**, 2, 89.

<sup>74</sup> Cluet, F.; Haudrechy, A.; Le Ver, P.; Sinoy, P.; Wick, A. *Synlett* **1994**, 913.

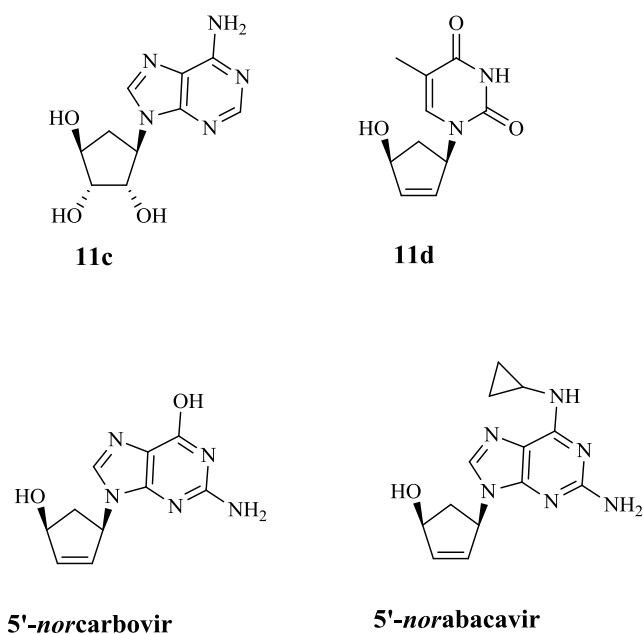
<sup>75</sup> Katagari, N.; Yamamoto, Y.; Ishikura, M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40 (51), 9069.

<sup>76</sup> Bhushan, R. G.; Vince, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 10 (7), 2325.



Una modificación importante en el pseudoazúcar es la supresión del C-5', lo que implica que el carbociclo posee una sustitución C-4'- $\beta$ - OH en lugar del grupo 4'-hidroxilmetil, obteniéndose derivados tipo 5'-norcarbanucleósidos.

Coe y col.<sup>77</sup> obtuvieron los carbanucleósidos de tipo 5'-*noraristeromicina* **11c** y ciclopentenol **11d**, como potenciales antivirales, cuya resolución enantiomérica se logró por vía enzimática.<sup>78</sup> Otros ejemplos de derivados antivirales son los 5'-*norcarbovir* y 5'-*norabacavir* que mostraron un perfil farmacológico equivalentes al carbovir y abacavir.<sup>79</sup>



Cabe destacar que la mayoría de los ACN obtenidos fueron ensayados biológicamente en su forma racémica por lo que, hoy en día, los esfuerzos en este campo se dirigen también hacia la obtención y posterior ensayo de dichos compuestos en sus formas enantioméricamente puras (o al menos con una riqueza enantiomérica alta).

<sup>77</sup> (a) Coe, D. M.; Hilpert, H.; Noble, S A.; Peel, M.; Roberts, S.; Storer, R. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 5, 312. (b) Coe, D. M.; Orr, D. C.; Roberts, S.; Storer, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1991**, 12, 3378.

<sup>78</sup> Merlo, V.; Reece, F.; Roberts, S.; Gragson, M.; Storer, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 15, 1717.

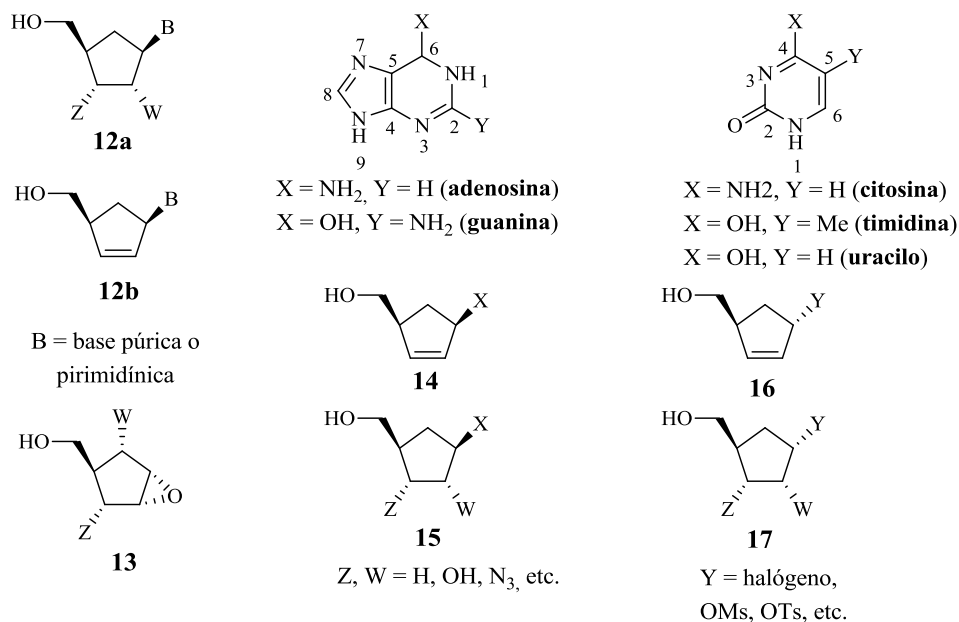
<sup>79</sup> Huang, W.; Miller, M. J.; De Clerq, E.; Balzarini, J. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5 (8), 1164.

Para ello podemos usar diversas técnicas, como por ejemplo, la resolución química y/o enzimática de mezclas racémicas,<sup>80</sup> la realización de síntesis enzimáticas,<sup>60,81,82</sup> o síntesis químicas convencionales a partir de ciclopentanos sustituidos ópticamente activos<sup>83</sup> y finalmente mediante síntesis enantioselectivas.<sup>84,85</sup>

## 1.4. METODOLOGÍA SINTÉTICA PARA EL DESARROLLO DE CARBANUCLEÓSIDOS

### 1.4.1. Planteamiento general

Las numerosas aproximaciones sintéticas para la obtención de carbanucleósidos de tipo **12** descritas en la bibliografía implican la formación inicial de un ciclopentano convenientemente funcionalizado, seguido de su acoplamiento de la base púrica o pirimidínica o a un precursor que permita la síntesis posterior de las mismas. De esta forma, los ciclopentanos funcionalizados **13-17** han de presentar una serie de elementos estructurales comunes: un grupo en la posición 1' (grupo hidroxilo o grupo saliente derivado del mismo, epóxido, etc.) que pueda ser desplazado por un sistema heterocíclico o que permita su integración en el sistema heterocíclico a sintetizar (grupo amino) y un grupo hidroximetilo o derivado análogo en la posición 4'.



<sup>80</sup> Secrist, J. A.; Montgomery, J. A.; Shealy, Y. F.; O'Dell, C. A.; Clayton, S. J. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 746.

<sup>81</sup> Arita, M.; Adachi, K.; Ito, Y.; Sawai, H.; Ohno, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 4049.

<sup>82</sup> Borthwick, A. D.; Butt, S.; Biggadike, K.; Exall, A. M.; Roberts, S. M.; Youds, P. M.; Kirk, B. E.; Booth, B. R.; Cameron, J. M.; Cox, S. W.; Marr, C. L. P.; Shill, M. D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 656.

<sup>83</sup> Madhavan, G. V. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 1287.

<sup>84</sup> Arai, Y.; Hayasi, Y.; Yamamoto, M.; Takayama, H.; Koizumi, T. *Chem. Lett.* **1987**, 185.

<sup>85</sup> Katagiri, N.; Aneda, T.; Hayasaka, E.; Watanabe, N.; Kaneko, C. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 226.

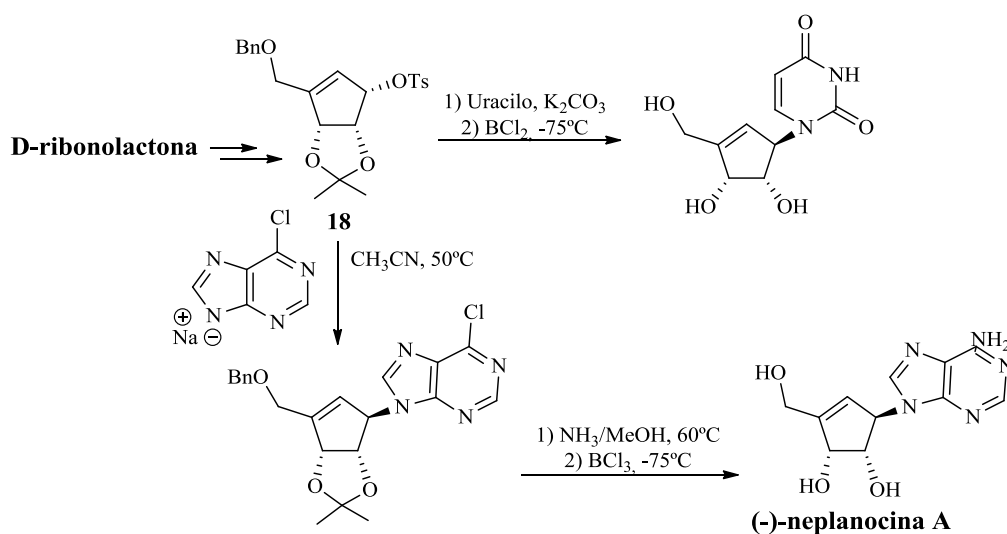
De esta forma, para el acoplamiento de la base heterocíclica se distinguirán dos tipos de aproximaciones sintéticas:

1. Sustitución nucleófila de un grupo lábil en la posición 1' del carbociclo por la base o un precursor de la misma. El proceso puede tener lugar a través del desplazamiento nucleófilo directo de un buen grupo saliente en posición 1'- $\alpha$  en estructuras de tipo **13**, **16** y **17** o a través de un complejo de paladio- $\pi$  a partir de un grupo saliente alílico en posición 1'- $\beta$  partiendo de un derivado **14**.
2. Construcción de la base a partir de una función amino en la posición 1'- $\beta$  del carbociclo tipo **14** y **15**.

#### 1.4.2. Introducción directa del sistema heterocíclico

En la bibliografía destacan cinco alternativas para la introducción directa de la correspondiente purina o pirimidina sobre los ciclopentanos funcionalizados **13**, **16** y **17**. Así, se puede introducir la base por desplazamiento nucleófilo,  $S_N2$ , de un grupo hidroxilo activado en 1'- $\alpha$ , apertura  $S_N2$  de un epóxido *anti*, desplazamiento de un grupo hidroxilo 1'- $\alpha$  mediante condiciones de Mitsunobu, adición tipo Michael sobre un ciclopentano o sustitución nucleófila de un complejo paladio- $\pi$  generado a partir de un grupo saliente de tipo alílico en posición 1'- $\beta$ .

*Sustitución nucleófila de un grupo hidroxilo activado.* La primera síntesis de un carbanucleósido por desplazamiento de un tosilato mediante la unidad heterocíclica fue la preparación de (-)-neplanocina A (Esquema 1).<sup>86,87</sup>



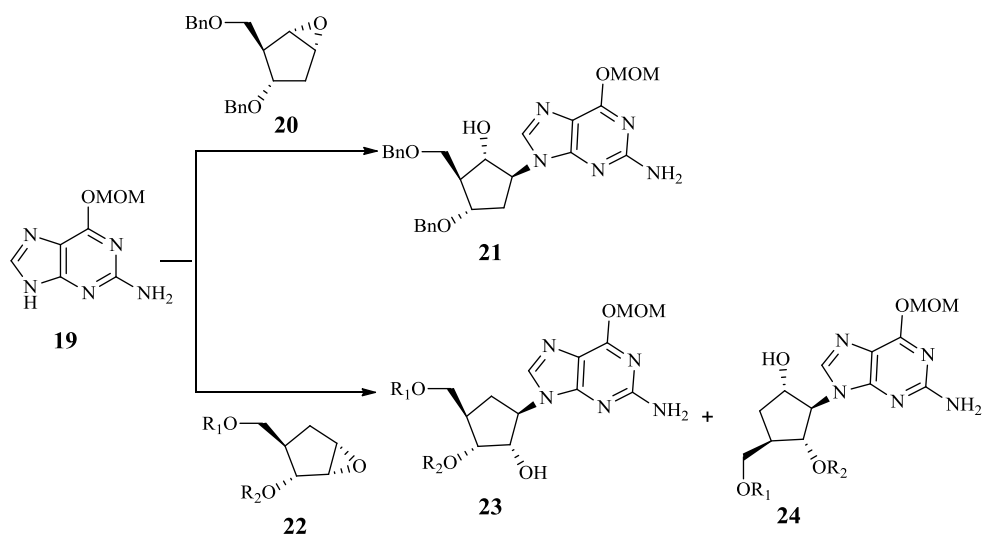
<sup>86</sup> Márquez, V.; Lim, M.; Tseng, C.; Markivac, A.; Priest, M.; Khan, M.; Kashar, B. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 5709.

<sup>87</sup> Tseng, C.; Márquez, V. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 3669.

El alcohol tosilado **18** se obtiene mediante un proceso enantioselectivo a partir de la D-ribonolactona. El uso de pirimidinas en la reacción de acoplamiento permitió la preparación de análogos de uridina siguiendo la misma ruta sintética.

*Apertura de un  $\alpha$ -epóxido.* La apertura de un epóxido de configuración adecuada preferentemente con la sal de una base púrica o pirimidínica en condiciones básicas conduce a la formación del nucleósido correspondiente con un hidroxilo en posición *anti* respecto a la base introducida. Debe tenerse en cuenta que el ataque del nucleófilo puede producirse en los dos centros del epóxido, cuando éste es asimétrico.

La utilización de grupos protectores adecuados permite regular la proporción de isómeros formados (**Esquema 2**). La reacción de una guanina protegida **19** con el epóxido **20** conduce selectivamente a la formación del carbanucleósido **21** con un 60% de rendimiento.<sup>88</sup> Análogamente, la apertura de **22** condujo a una mezcla 3:2 de los alcoholes **23** y **24**.



Esquema 2

*Reacción de Mitsunobu.* Un alcohol primario o secundario puede ser sustituido por una base heterocíclica bajo las condiciones clásicas de Mitsunobu.<sup>89</sup> En el caso de un alcohol secundario, el proceso transcurre con inversión de configuración (**Esquema 3**).<sup>90</sup>

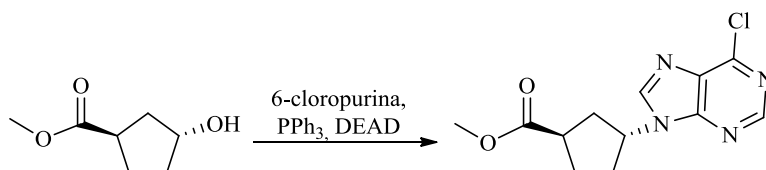
El método puede extenderse a otras bases, siempre y cuando se haga una adecuada protección de los grupos nucleófilos presentes en las mismas.<sup>91</sup>

<sup>88</sup> Biggadike, K.; Borthwick, A. D.; Exall, A. M.; Kirk, B. E.; Roberts, S. M.; Youds, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 1083

<sup>89</sup> (a) Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1. (b) Hughes, D. L. *Organic Reactions*, Paquette, L. A. vol.42, Ed. John Wiley and Sons: New York **1992**, p. 344.

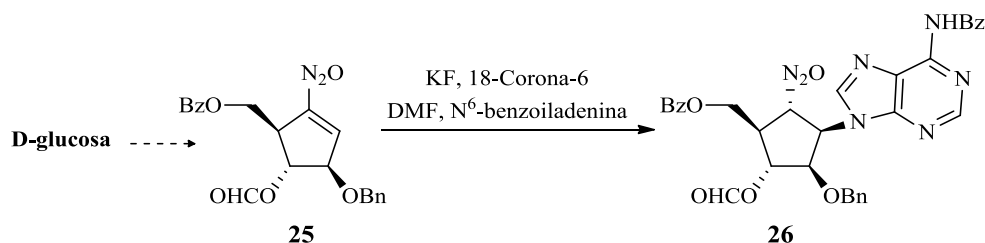
<sup>90</sup> Jenny, T.; Horlacher, J.; Previsani, N.; Benner, S. *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 1944.

<sup>91</sup> Hubert, C.; Alexandre, C.; Aubertin, A. M.; Huer, F. *Tetrahedron* **2002**, 58, 3775.



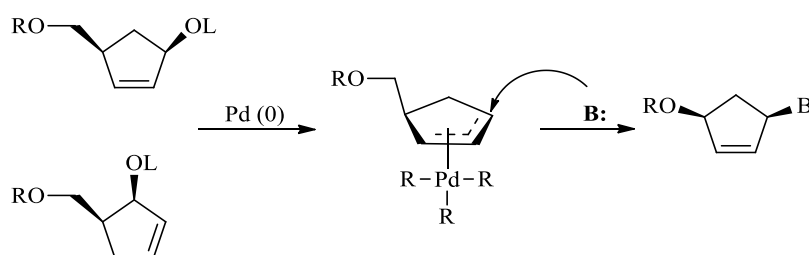
Esquema 3

*Adición de Michael.* Este método ha sido usado para la preparación de derivados púricos de ACN.<sup>92,93</sup> Como se indica en el **esquema 4**, la adición de N<sup>6</sup>-benzoiladenina sobre la estructura ciclopenténica **25** condujo en las condiciones indicadas al carbanucleósido **26**. El compuesto **25** se obtuvo en quince etapas a partir de la D-glucosa.



Esquema 4

*Introducción vía complejo de paladio- $\pi$ .* Esta metodología<sup>94</sup> resulta más limitada que las vistas anteriormente ya que además de un grupo lábil en posición 1'- $\beta$  del carbociclo (p.ej., un grupo acetilo), debe existir un doble enlace en posición alílica (**Esquema 5**).



Esquema 5

Este procedimiento se ha utilizado para sintetizar la aristeromicina<sup>95</sup> por acoplamiento entre un epóxido alílico y adenina, catalizado por paladio (0) y vía formación del complejo de paladio, que constituye el intermedio clave de la reacción.<sup>96</sup>

<sup>92</sup> Yoshiwaka, M.; Nakae, T.; Cha, B.; Yokokawa, Y.; Kitagawa, I. *Chem. Phar. Bull.* **1989**, 37, 545.

<sup>93</sup> Yoshiwaka, M.; Okaichi, M.; Cha, B.; Kitagawa, I. *Tetrahedron* **1990**, 46, 7459.

<sup>94</sup> Gundersen, L. L.; Benneche, T.; Undheim, K. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 1085.

<sup>95</sup> Trost, B. M.; Kuo, G. H.; Benneche, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 621.

<sup>96</sup> Trost, B. M.; Verhoeven, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 4730.

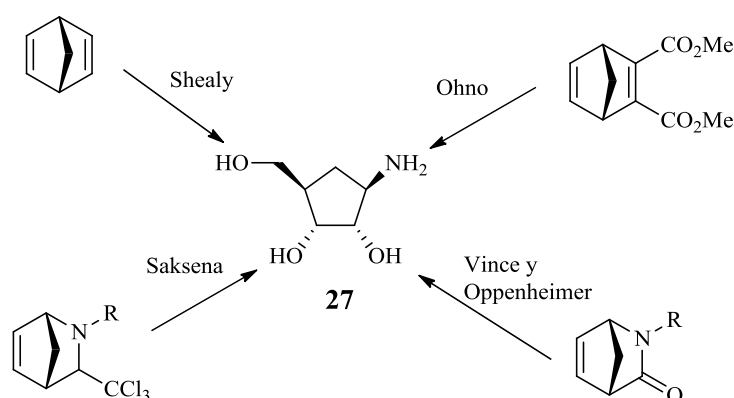
### 1.4.3. Construcción de la base heterocíclica natural o modificada

Esta estrategia conlleva en primer lugar la formación de una cicloalquilamina de estructura adecuada, o de su precursor nitrogenado, sobre los cuales se constituye posteriormente el sistema heterocíclico.

#### 1.4.3.1. Síntesis de cicloalquilaminas funcionalizadas

Este grupo de reacciones es uno de los más desarrollados y la estrategia básica para la preparación de carbanucleósidos no ha sido sustancialmente modificada desde el trabajo inicial de Shealy y col.<sup>97</sup> en el que la ribofuranosilamina carbocíclica **27** fue el intermediario sobre el que se construyó posteriormente la base heterocíclica.

Muchos de los métodos registrados en la bibliografía parten de sistema de biciclo [2.2.1]hepteno tipo [C=C] o [C-N], que al ser rígidos, presentan la ventaja de tener ya fijada la configuración de las posiciones que serán C-1' y C-4' en la molécula final (**Esquema 6**).



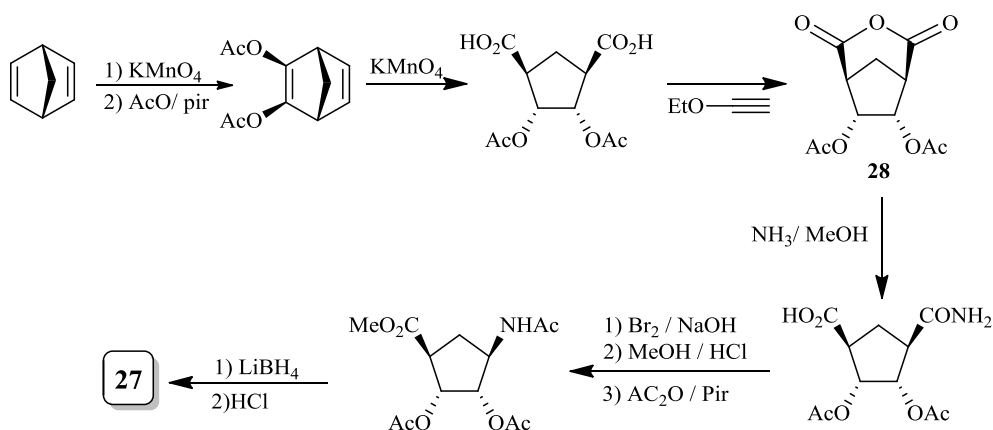
**Esquema 6**

La síntesis racémica más clásica de un carbanucleósido se debe a Shealy y cols.<sup>98</sup> (**Esquema 7**). La hidroxilación *cis* del 2,5-norbornadieno seguida de la protección de los grupos hidroxilo da origen a un diacetato, que por ruptura oxidativa de su doble enlace conduce al correspondiente diácido, cuyo tratamiento con etoxiacetileno, rinde el anhídrido **28**.

Éste, mediante amonólisis en condiciones anhidras, degradación de Hofman, formación del éster metílico, acetilación y reducción de los grupos éster con LiBH<sub>4</sub>, genera tras la hidrólisis final el *ribo*-aminoalcohol **27**.

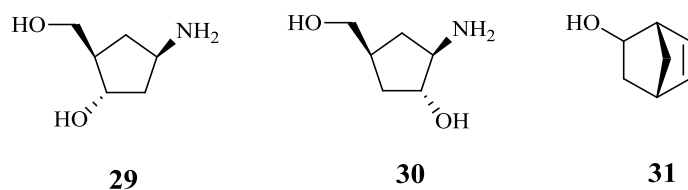
<sup>97</sup> Shealy, Y. F.; Clayton, J. J. *Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3885.

<sup>98</sup> Shealy, Y. F.; Clayton, J. J. *Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 3075.

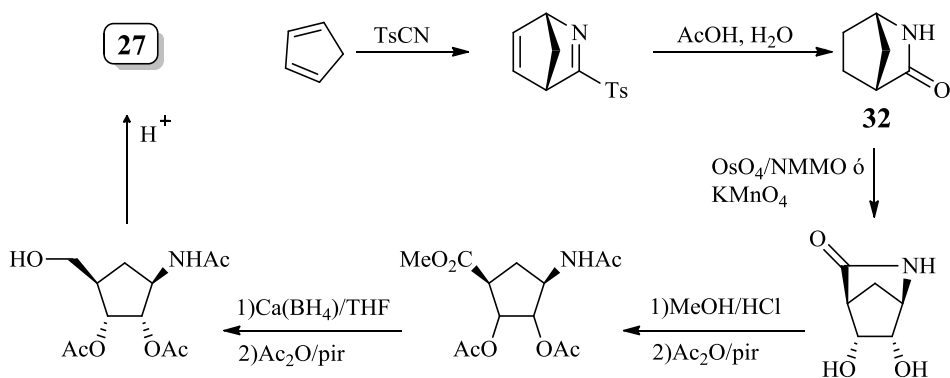


Esquema 7

Este diseño sintético permite también preparar los correspondientes 2'- y 3'-desoxirriboaminoalcoholes **29** y **30**, respectivamente, usando como sustancia de partida *exo*-5-norbornenol, **31**.<sup>97,98</sup>



Posteriormente Vince y cols.<sup>99,100</sup> emplearon para la preparación del aminoalcohol **27** la 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona **32** obtenida a su vez por una cicloadición de Diels-Alder de ciclopentadieno y cianuro de *p*-toluenosulfonilo (**Esquema 8**).<sup>101</sup>



Esquema 8

<sup>99</sup> Cermak, R. C.; Vince, R. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 2331.

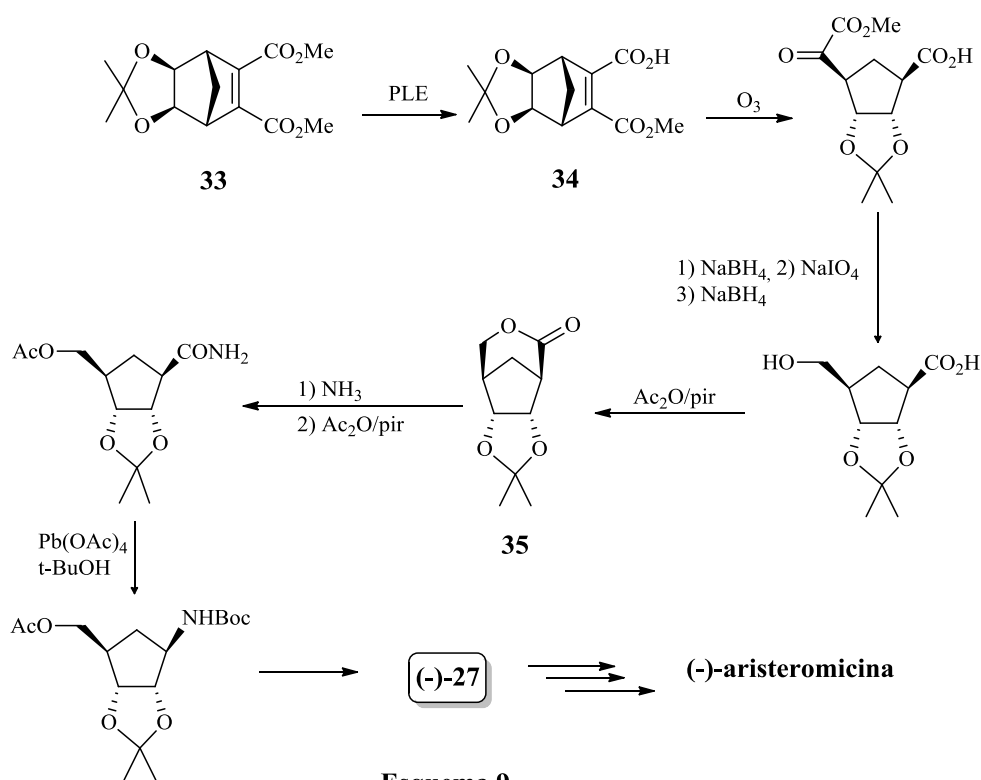
<sup>100</sup> Kam, B. L.; Oppenheimer, N. J. *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 3268.

<sup>101</sup> Jagt, J. C.; Van Leusen, A. M. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 564.



En lo referente a las *síntesis enantioselectivas* cabe destacar la enzimática de Ohno y cols.,<sup>81</sup> (**Esquema 9**) en la que se perfecciona el proceso de Shealy, preparando el enantiómero apropiado de uno de los precursores asimétricos por acción de la *hidrolasa* PLE (*esterasa* del hígado de cerdo) sobre un compuesto proquiral<sup>102</sup> o *meso*<sup>103</sup>.

La etapa clave de esta síntesis es la hidrólisis asimétrica del diéster insaturado *meso* **33** por la acción de la PLE para generar el hemiéster **34** enantioméricamente puro, que sometido a un laborioso proceso sintético de degradación y modificación funcional conduce a la aristeromicina idéntica a la natural.

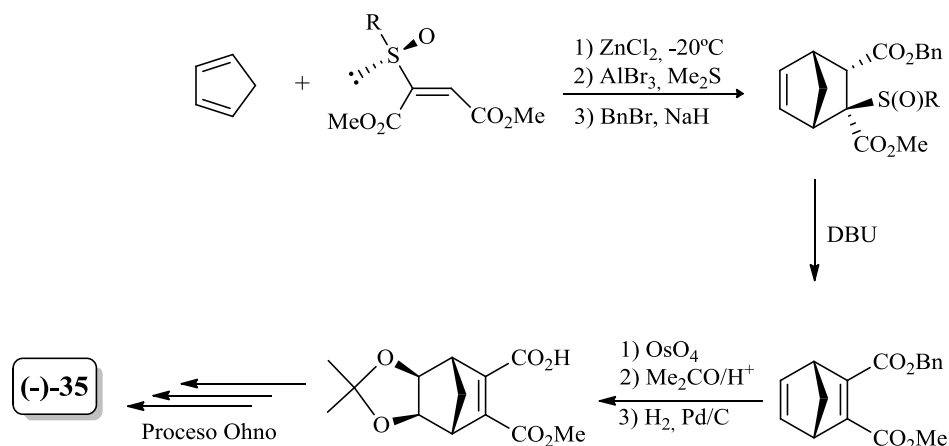


Como ejemplo de *síntesis químicas enantioselectivas*, cabe citar la llevada a cabo por Koizumi y cols.,<sup>104</sup> (**Esquema 10**) basada en una reacción de Diels-Alder asimétrica entre el (R<sub>s</sub>)-2-(10-isobornil)sulfinilmaleato de dimetilo y ciclopentadieno, rindiendo un aducto cíclico, que posteriormente es transformado, después de varias etapas, en un hemiéster asimétrico que sometido al proceso Ohno rinde la lactona **35** enantioméricamente pura.

<sup>102</sup> Ohno, M.; Kobayashi, S.; Iimori, T.; Wang, Y. F. Izawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2405.

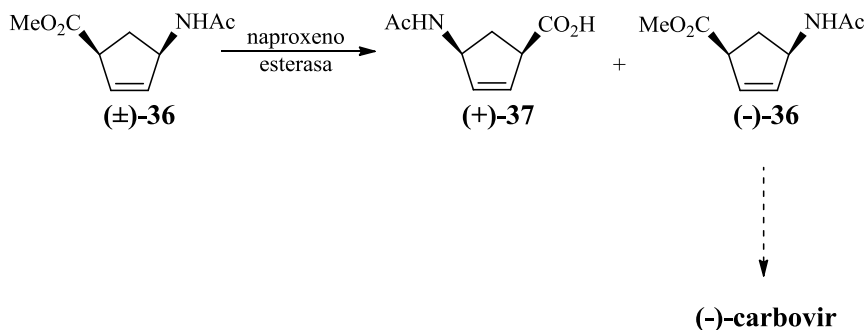
<sup>103</sup> Ito, Y.; Shibata, T.; Arita, M.; Sawai, H.; Ohno, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6739.

<sup>104</sup> Arai, Y.; Hayasi, Y.; Yamamoto, M.; Takayama, H.; Koizumi, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1988**, 3133.



Esquema 10

Otro ejemplo de síntesis enantioselectiva lo encontramos en la preparación del carbovir (**Esquema 11**) desarrollada por Hande y cols.,<sup>105</sup> que resuelve el acetoamidoéster insaturado ( $\pm$ )-**36** (intermediario clave en el proceso sintético) mediante el empleo de la *naproxeno* esterasa.



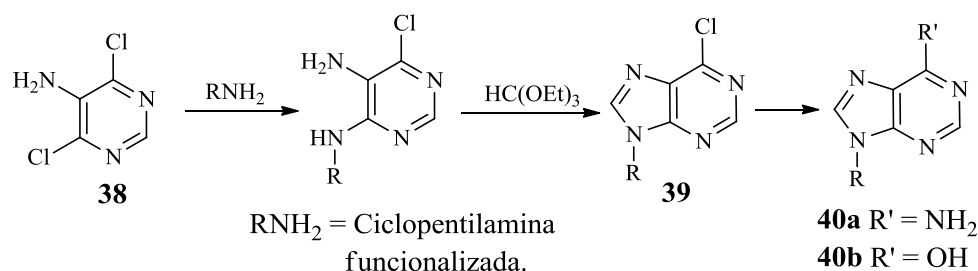
Esquema 11

#### 1.4.3.2. Construcción de la base heterocíclica

**Construcción de derivados púricos:** Las estrategias sintéticas conducentes a la preparación de derivados Carbocíclicos de la adenina y análogos a partir de aminoalcoholes convenientemente funcionalizados siguen las directrices pioneras de Shealy y Clayton,<sup>106</sup> (**Esquema 12**).

<sup>105</sup> Hande, S.; Earlam, G. J.; Geary, P. J.; Hewes, J. E.; Phillips, G. T.; Pryce, R. J.; Rybock, G.; Shears, J. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1994**, 1885.

<sup>106</sup> Shealy, Y. F.; Clayton, J. *J. Pharm. Sci.* **1973**, 62, 858.



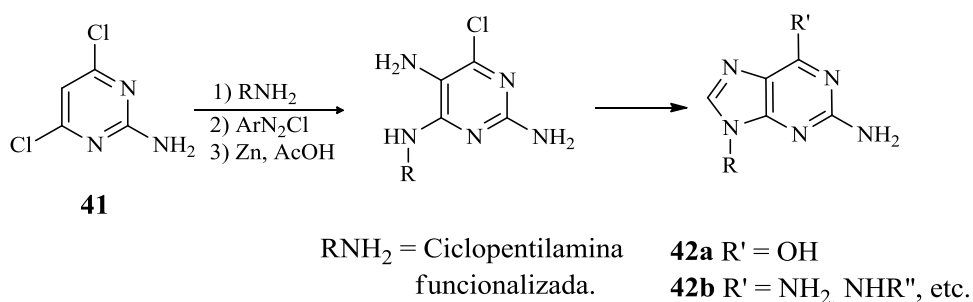
**Esquema 12**

Esta estrategia consiste en la reacción de una ciclopentilamina convenientemente funcionalizada ( $\text{R-NH}_2$ ) con el precursor tipo **38** y posterior formación del anillo B de la purina mediante el uso de ortoformiato de trietilo en medio ácido, obteniéndose la consiguiente cloropurina **39**, que por sustitución del átomo de cloro en la posición 6 del heterociclo rendiría los derivados de adenina **40a** y **40b**.

El proceso permite obtener no solo estos derivados sino también establecer otras modificaciones en posición  $\text{N}^6$  de la base como 6-alcoxi, 6-alquiltio, 6-alquilaminopurinas análogas, sin más que tratar el 6-cloroderivado precursor con el correspondiente nucleófilo.

De la misma manera, por reacción de acoplamiento Suzuki-Miyaura<sup>107</sup> pueden introducirse diversos restos de arilo en posición 6 de la cloropurina.

Para la preparación de los derivados de guanina **42a** se parte de la 2-amino-4,6-dicloropirimidina (**41**) y se introduce el grupo amino en C5 a partir de una sal de diazonio. Otros análogos de 2,6-diaminopurinas, **42b**, también son asequibles por esta estrategia (**Esquema 13**).

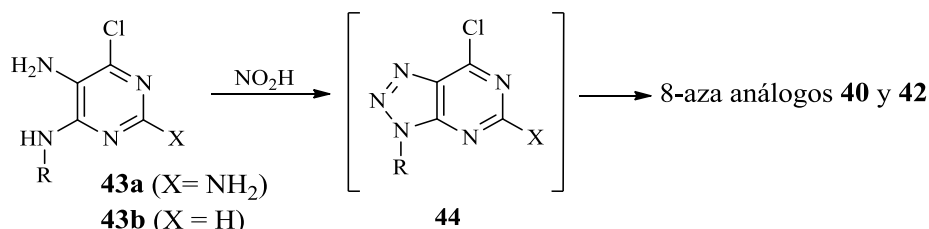


**Esquema 13**

Es importante señalar que si la ciclación intramolecular para la formación del anillo B condensado se realiza por diazotación del derivado **43** (**Esquema 14**), se obtienen los derivados

<sup>107</sup> Suzuki, A. *J. Organomet. Chem.* **1999**, 576, 147.

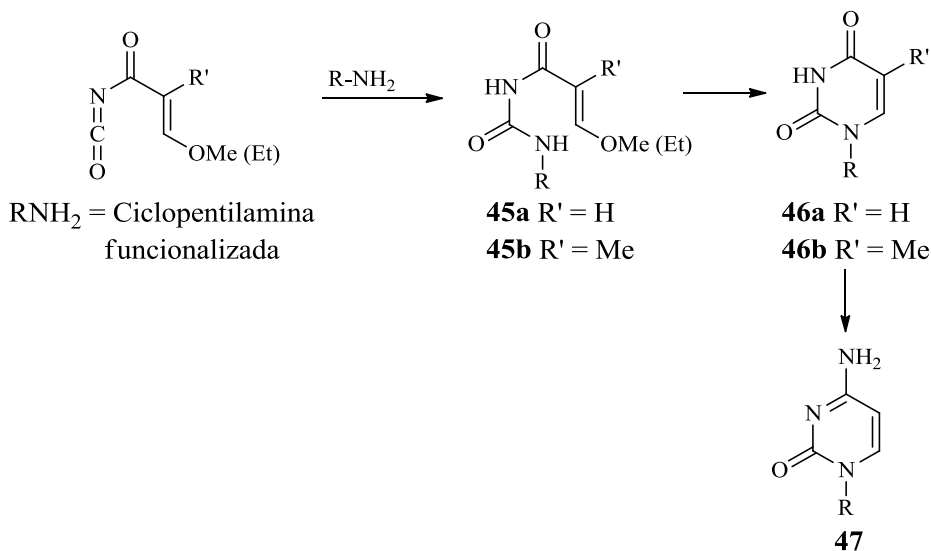
6-cloro-8-azapurina, **44**, los cuales son altamente reactivos y no son aislados en ningún caso,<sup>106,108</sup> sino que se procede *in situ* a reemplazar el átomo de cloro de la posición 6 por un grupo amino u otro análogo, mediante una metodología similar a que acabamos de comentar.



Esquema 14

**Construcción de derivados pirimidínicos:** Para la síntesis de este tipo de derivados se sigue habitualmente el método de Shaw y Warrener<sup>109,110,111</sup> (**Esquema 15**), donde por reacción de una ciclopentilamina debidamente funcionalizada ( $\text{R-NH}_2$ ) con isocianato de  $\beta$ -alcoxiacrililo se forma el derivado de urea **45**, que por ciclación en medio ácido o básico da lugar a los derivados de uridina **46a** o timidina **46b**.

Los derivados de citidina **47** se preparan a partir de precursores tipo **46a** vía amonólisis.



Esquema 15

<sup>108</sup> Vince, R.; Daluge, S. J. *Org. Chem.* **1980**, 45, 531.

<sup>109</sup> Shaw, G.; Warrener, R. J. *Chem. Soc.* **1958**, 153.

<sup>110</sup> Shaw, G.; Warrener, R. J. *Chem. Soc.* **1958**, 157.

<sup>111</sup> Hronowski, L. J.; Szarek, W. A. *Can. J. Chem.* **1985**, 63, 2787.

## ***2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS***



## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Debido a las favorables expectativas levantadas por el descubrimiento del carbovir,<sup>57</sup> que es capaz de inhibir selectivamente el VIH-1 y de que el abacavir<sup>26,27,28,29</sup> mantiene dicha capacidad, mejorando de manera manifiesta su biodisponibilidad por vía oral, orientamos en los últimos años, nuestra atención a la preparación y posterior evaluación biológica de nuevos ACN análogos de los citados compuestos, en los que reemplazamos el anillo de ciclopenteno, presente en ambos compuestos, por un anillo de indano. Es decir, sustituimos la nube  $\pi$  alquénica por una nube  $\pi$  aromática, con la idea de conseguir compuestos que presenten una mayor biodisponibilidad por vía oral y facilitar el incremento de concentración de dichos fármacos en el sistema nervioso central, reservorio importante para el proceso de replicación viral y lugar de “escondite” de los virus.

Aunque no existe ninguna sistematización que relacione la estructura de los análogos de nucleósidos con su actividad biológica, se admite, después de la realización de estudios estructurales con diferentes compuestos que poseen actividad anti-VIH, que las moléculas dispuestas en forma de “alas de mariposa” presentan una gran capacidad de interacción con la *transcriptasa inversa*.

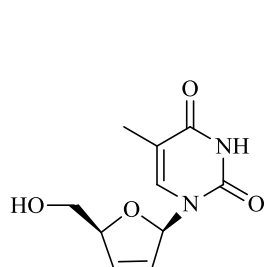
Trabajando en esta idea y en línea de preparar nuevos derivados de la estavudina, fármaco aprobado por la FDA en el año 1994 para el tratamiento de las infecciones por VIH en uso combinado con otros antirretrovirales, el grupo de investigación dirigido por Mackenzie preparó un derivado benzocondensado de la estavudina, **48**,<sup>112</sup> en el que podemos observar como el doble enlace existente en el anillo furánico de la misma se incorpora a un anillo bencénico, obteniéndose así, un análogo nucleosídico derivado del sistema benzo[c]furano.

La presencia de este anillo bencénico implica un importante incremento de la lipofilia del compuesto resultante, lo que posibilita una mayor difusión del mismo a través de la barrera hematoencefálica y por lo tanto favorece el ataque de este compuesto a los reservorios virales sitios en el sistema nervioso central.

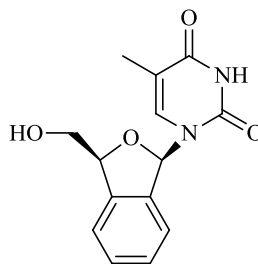
Asimismo, la introducción del anillo bencénico limita la libertad conformacional del compuesto resultante como consecuencia de la introducción de un mayor grado de restricción conformacional lo cual debe facilitar las interacciones con las diferentes enzimas virales.

---

<sup>112</sup> Swing, D. F.; Fahmi, N. E.; Len, C.; Mackenzie, G.; Pranzo, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2000**, 3561.

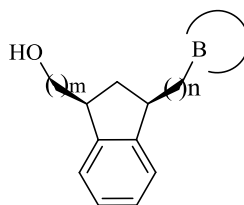


estavudina



48

La translación de las aportaciones realizadas por Mackenzie al campo de los ACN hizo que iniciáramos, en nuestro grupo de investigación, un trabajo sistemático encaminado a la preparación de diferentes compuestos en los que la parte correspondiente al azúcar de los nucleósidos naturales estuviera conformada por un anillo de indano, carboanálogo del agrupamiento benzo[*c*]furano, con el objetivo de preparar series de compuestos en los que la distancia entre el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo y el átomo de nitrógeno de la base púrica o pirimidínica, fuese variable, con el objetivo de poder evaluar también la influencia de la misma en el comportamiento biológico de estos compuestos.



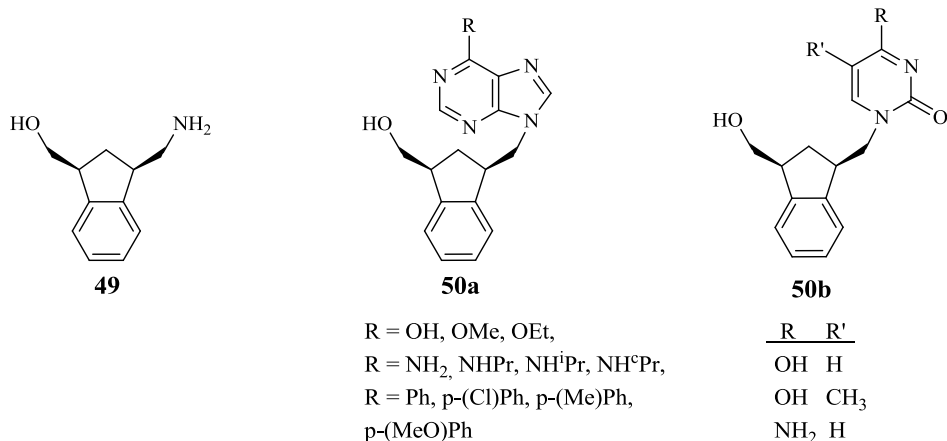
$$\begin{aligned} n &= 0, 1 \\ m &= 0, 1 \end{aligned}$$

Así en los años 2002 y 2003 describimos la preparación de una nueva familia de carbanucleósidos derivados del aminoalcohol ( $\pm$ )-*cis*-3-aminometil-1-indanilmetanol (**49**) portadores de bases púricas, **50a**,<sup>113</sup> y pirimidínicos, **50b**,<sup>114</sup> que presentaron un interesante comportamiento en sus primeros ensayos biológicos y que desde el punto de vista estructural se caracterizan por presentar un grupo metileno adicional entre el anillo de indano y la base púrica o pirimidínica, siendo por tanto derivados 1'-homocarbannucleósidos.

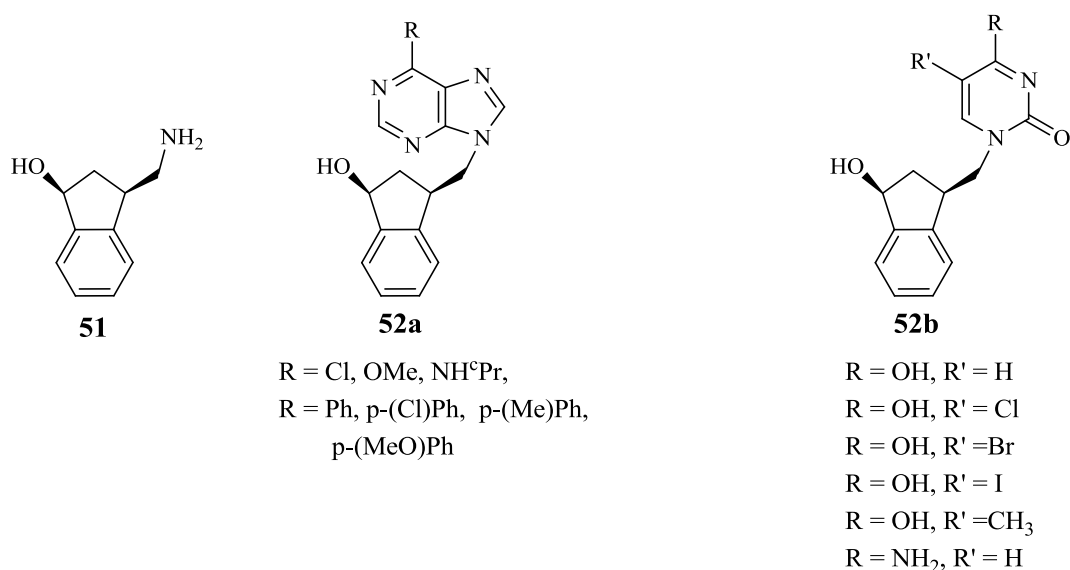
<sup>113</sup> Fernández, F.; García-Mera, X.; Morales, M.; Rodríguez-Borges, J. E.; De Clercq, E. *Synthesis* **2002**, 8, 1084.

<sup>114</sup> Yao, S. W.; López, V. H. C.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Morales, M.; Rodríguez-Borges, J. E.; Cordeiro, M. D. N. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 4999.





Como continuación de este trabajo, llevamos a cabo la preparación de una segunda familia de carbanucleósidos derivados del aminoalcohol (±)-*cis*-3-aminometil-1-indanol (**51**), tanto análogos púricos, **52a**,<sup>115</sup> como pirimidínicos, **52b**,<sup>116</sup> en los que el grupo hidroxilo de los mismos está directamente enlazado al anillo de indano acortándose, por lo tanto, la distancia existente entre el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo y el átomo de nitrógeno de la base, con la idea de estudiar la influencia del grupo metileno, que tradicionalmente une el grupo hidroxilo con la fracción del azúcar, en las actividades antiviral y/o antitumoral, en esta serie de compuestos. Estos compuestos por la unión que presentan del grupo hidroxilo y de la base púrica al azúcar, unión justamente inversa a la que presentan los nucleósidos naturales y los análogos clásicos, pertenecen a una nueva clase de análogos conocidos como *Análogos Reversos*.



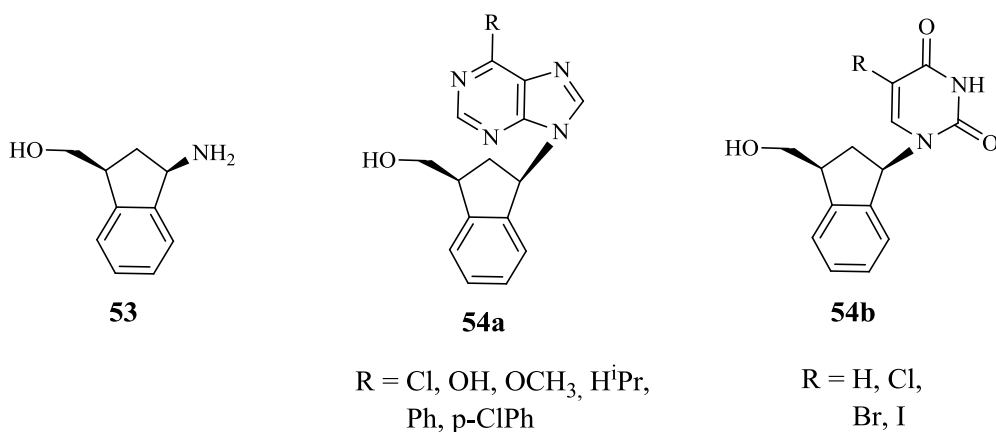
<sup>115</sup> Fernández, F.; García-Mera, X.; Morales, M.; Vilariño, L.; Caamaño, O.; De Clercq, E. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9245

<sup>116</sup> Fernández, F.; García-Mera, X.; López, C.; Morales, M.; Rodríguez-Borges, J. E. *Synthesis* **2005**, *20*, 3549-3554.

Para finalizar el trabajo inicialmente previsto y luego de la preparación y posterior evaluación biológica de las series 1'-homocarbannucleósidos indánicos, **50**, y de los análogos reversos indánicos, **52**, (derivados de tipo 5'-nor-1'-homocarbannucleósidos), solo restaba preparar los denominados “auténticos” análogos de derivados del indano.

Se denominan así a aquellos derivados en los que la unión de la base y del grupo hidroxilo con el azúcar se realiza de idéntica manera a los nucleósidos naturales.

Con lo que como primer objetivo concreto de este trabajo, se prepararon los análogos púricos, **54a** y los pirimidínicos, **54b**, los cuales se pueden considerar derivados del aminoalcohol ( $\pm$ )-*cis*-3-amino-1-indanilmetanol (**53**).<sup>117</sup>



Todos los compuestos preparados han sido sometidos a un proceso inicial de evaluación farmacológica al objeto de conocer su actividad biológica (antiviral y citostática) frente a diversos virus ADN y ARN, así como la citotoxicidad para diversas líneas celulares hospedadoras.

El conjunto de estos trabajos, síntesis y evaluación farmacológico, ha sido publicado en la siguiente revista científica:

- Alonso, N.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Morales, M.; Rodríguez-Borges, J. E. *Synthesis* **2008**, *12*, 1845.

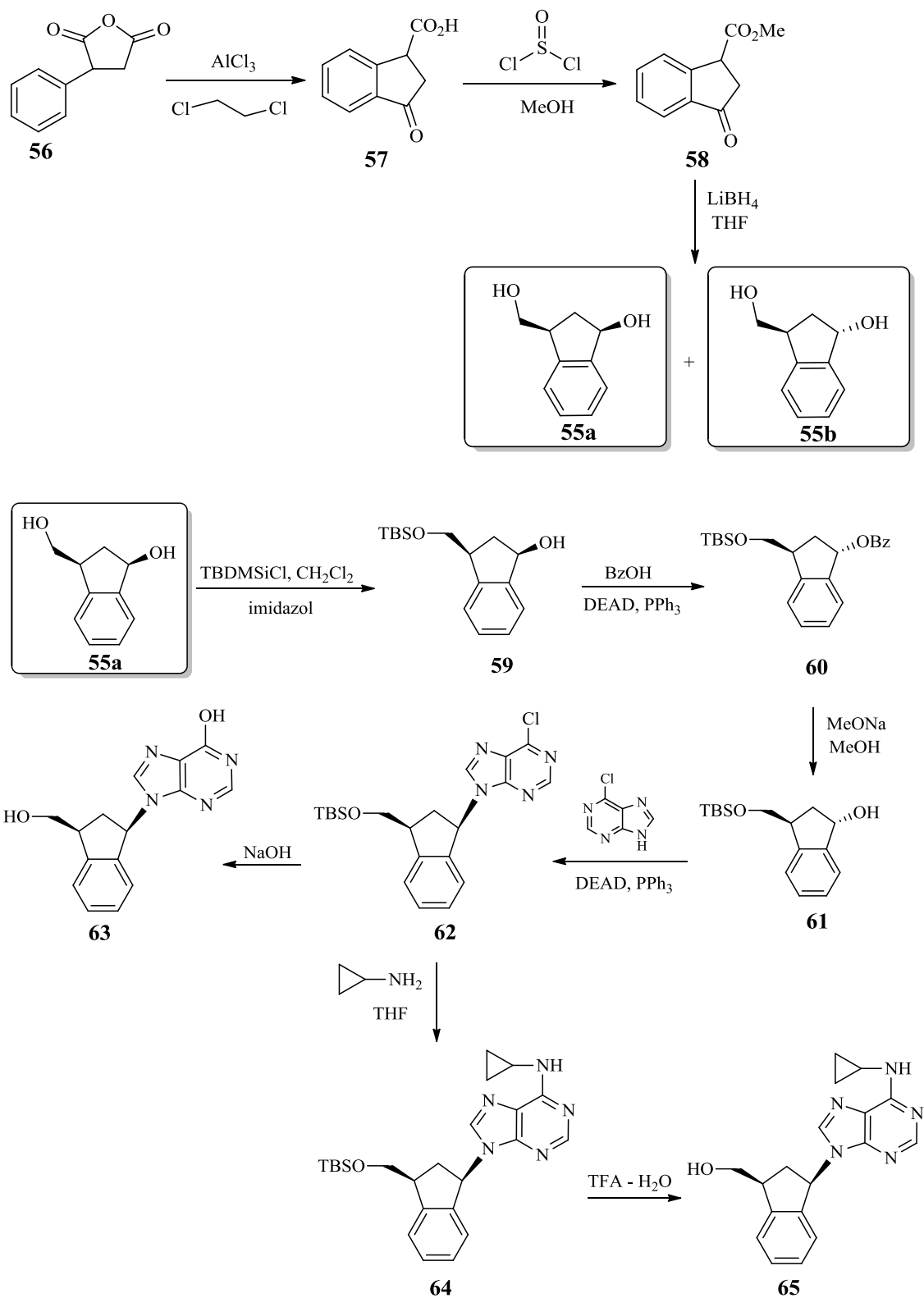
<sup>117</sup> Alonso, N.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Morales, M.; Rodríguez-Borges, J. E. *Synthesis* **2008**, *12*, 1845.

### ***3. QUÍMICA: PARTE TEÓRICA Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS***



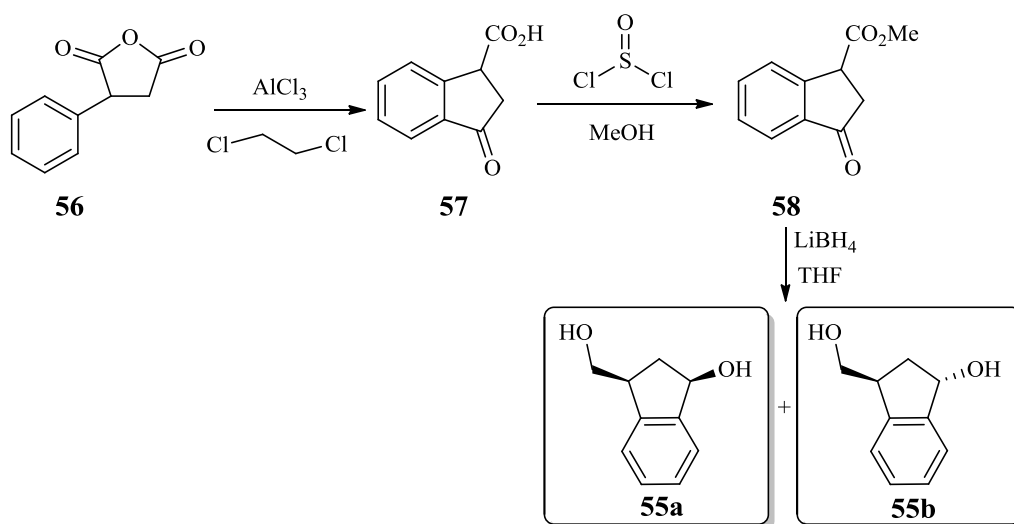


Partiendo del aminoalcohol correspondiente construiremos el agrupamiento pirimidínico sobre el átomo de nitrógeno.



### 3.1.1. Síntesis de dioles

El procedimiento de preparación de los dioles **55a** y **55b** se recoge en el **esquema 16**:



Esquema 16

La síntesis del núcleo 3-oxo-1-indancarboxílico **57** ha sido descrita a partir de derivados del ácido fenilsuccínico empleando  $\text{AlCl}_3$  como ácido de Lewis, siendo los rendimientos alrededor del 60%.<sup>118,119</sup> Sin embargo, los rendimientos han sido superiores cuando el compuesto de partida ha sido el anhídrido fenilsuccínico.<sup>120</sup>

Nosotros hemos aprovechado este efecto de condensación del anillo para obtener con buen rendimiento (> 80%) el cetoácido **57** a partir del anhídrido fenilsuccínico (**56**), utilizando el  $\text{AlCl}_3$  como catalizador de la reacción y 1,2-dicloroetano como disolvente.<sup>121</sup>

A continuación y por reacción de **57** con metanol y cloruro de tionilo obtuvimos 3-oxo-1-indanocarboxilato de metilo (**58**) con un rendimiento del 86%.

#### 3.1.1.1. Reducción de cetoésteres con borohidruro de litio. Obtención de la mezcla de dioles **55a** y **55b**.

La reducción de cetoésteres se encuentra ampliamente descrita en la literatura y es una de las más importantes transformaciones en síntesis orgánica. El rendimiento de la reacción así como los productos que se obtienen dependen fundamentalmente del tipo y naturaleza del reductor.<sup>122</sup>

<sup>118</sup> Bachar, S. C.; Lahiri, S. C. *Bangladesh Chem. Soc.* **2000**, 13 (1-2), 125.

<sup>119</sup> Hansen, H. J.; Sliwka, H. R.; Hug, W. *Helv. Chim. Acta* **1982**, 65 (1), 325.

<sup>120</sup> Vebrel, J.; Carrie, R. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1982**, (5-6, Pt.2), II-161.

<sup>121</sup> Hashimoto, J.; Takatsuka, R. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1977**, 50 (9), 2495.

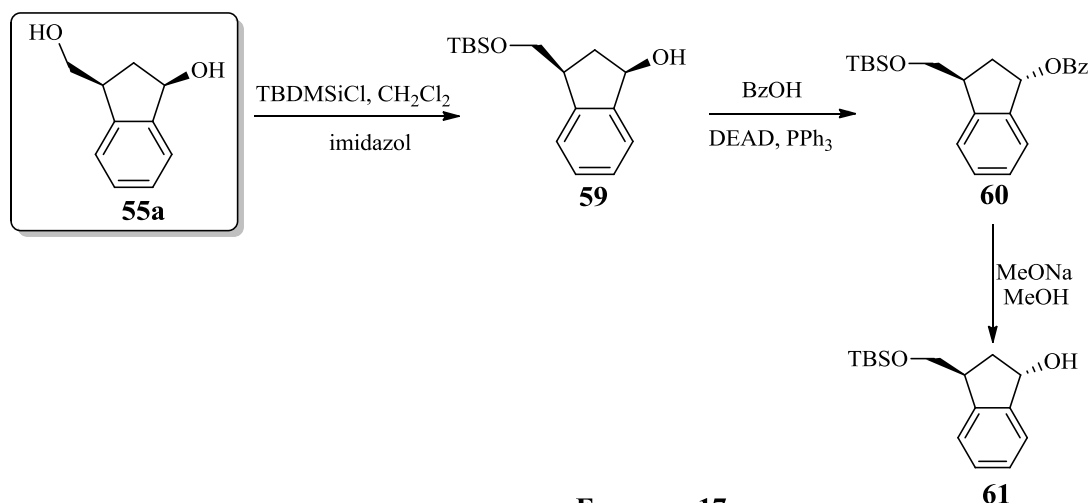
<sup>122</sup> Dreiding, A. S.; Hartman, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 939.

Desde su descubrimiento, el  $\text{NaBH}_4$  ha demostrado ser un reactivo muy útil para la reducción selectiva de aldehídos y cetonas. Sin embargo, su uso no se puede extender a la reducción de ésteres y otros grupos funcionales relativamente difíciles de reducir, debido a su baja reactividad<sup>123</sup>

A pesar de esto, las propiedades reductoras de este agente se pueden ver aumentadas, variando el disolvente, el catión, usando un catalizador o con el uso de aditivos.<sup>124</sup> Una manera de acelerar notablemente la reacción y completar el proceso de reducción consiste en utilizar sales de borohidruro, cuyos cationes sean ácidos de Lewis más fuertes, tales como el  $\text{LiBH}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{BH}_4)_2$  y  $\text{Ca}(\text{BH}_4)_2$ .<sup>125,126,127</sup>

En nuestro caso concreto, una síntesis eficiente de **55a** y **55b** se consiguió por reducción de **58** con 5 equivalentes de  $\text{LiBH}_4$  en THF anhidro. Así se obtuvo la mezcla de dioles **55a** y **55b** en una proporción *cis/trans* 80:20. Dicha mezcla fue convenientemente resuelta por cromatografía en columna empleando como eluyente DCM/metanol (40:1), lo cual nos permitió obtener de modo fácil y rápido dichos dioles.

A partir de este momento la estrategia a seguir fue doble. Por un lado, el isómero *cis* obtenido, compuesto claramente mayoritario, fue empleado como precursor de determinados derivados carbanucleosídicos, **63** y **65**, realizando para ello un proceso de inversión de la configuración al objeto de obtener el diol con la configuración *trans* adecuada **61** mediante la secuencia de reacciones descrita en el **esquema 17**.



<sup>123</sup> Yinan, X.; Wei, Y. *Synth. Commun.* **2010**, 40 (22), 3423.

<sup>124</sup> Kim, J.; De Castro, K. A.; Lim, M.; Rhee, H. *Tetrahedron* **2010**, 66 (23), 3995.

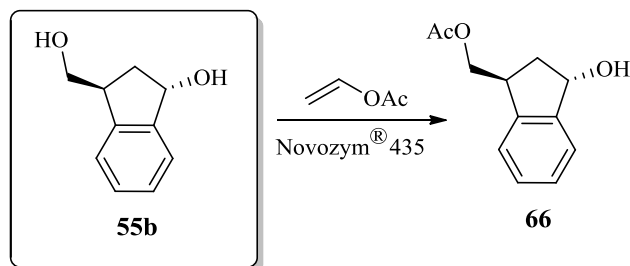
<sup>125</sup> Brown, H. C.; Narasimham, S.; Choi, Y. M. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 4702.

<sup>126</sup> Nystom, R. F.; Chaikin, W.; Brown, W. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 3245.

<sup>127</sup> Fernández, F.; López, C.; Hergueta, A. R. *Tetrahedron*, **1995**, 51, 10317.



Por otra parte, el isómero *trans* obtenido fue utilizado directamente, ya que su disposición es la correcta, para preparar los restantes análogos carbanucleosídicos, **68**, **71**, **72** y **73**, previa protección del grupo hidroxilo metanólico bajo la forma de acetato (**Esquema 18**).



Esquema 18

### 3.1.2. Reacciones de protección de alcoholes: sililación y acetilación

#### 3.1.2.1. Obtención del ( $\pm$ )-*cis*-3-(*tert*-butildimetilsililo)metilindanol (**59**)

Los éteres de silicio son uno de los grupos protectores más habituales de la función alcohol, y tienen la ventaja de ser bastante estables frente a una gran variedad de reactivos orgánicos y de ser fácilmente eliminables en condiciones que no alteran otros grupos funcionales.

Tiene una excelente estabilidad frente a bases pero son relativamente sensibles a ácidos. En concreto, los éteres de *tert*-butildimetilsililo y de *tert*-butildifenilsililo son los grupos protectores sililados más usados en síntesis orgánica.<sup>128</sup>

Un método que conduce, con buenos rendimientos, a la protección de alcoholes, es el desarrollado por Corey y col,<sup>129</sup> donde tratan el alcohol con TBDMSCl/imidazol a temperatura ambiente en el seno de DMF. Este método transcurre con mejores rendimientos cuando las reacciones son muy concentradas.

Otro método que conduce, con buenos rendimientos, a la protección, consiste en tratar el alcohol con TBDMSCl en presencia de NaH/THF, transcurriendo la reacción en THF.

En nuestro caso concreto, por reacción de **55a** con cloruro de *tert*-butildimetilsililo e imidazol en diclorometano se preparó el compuesto **59**, con un rendimiento del 54%.

<sup>128</sup> Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3<sup>rd</sup> ed., John Wiley and Sons, New York, **1999**.

<sup>129</sup> Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190.

### 3.1.2.2. Obtención del acetato de ( $\pm$ )-trans-3-hidroxi-1-indanilmetilo (**66**)

La derivatización o protección selectiva de un grupo hidroxilo en presencia de otro en una misma molécula constituye un reto que se presenta con frecuencia en síntesis orgánica.<sup>130</sup>

Los grupos hidroxilo no equivalentes químicamente, como primarios, secundarios o terciarios, pueden ser rápidamente diferenciados mediante estrategias convencionales de protección/desprotección.<sup>128</sup>

En nuestro caso concreto, ante la necesidad de derivatizar y diferenciar los grupos hidroxilo del diol ( $\pm$ )-trans-**55b** y poder funcionalizar de manera conveniente uno de ellos para posteriormente introducir o crear la base heterocíclica sobre el grupo hidroxilo libre, hemos realizado una protección vía acetato del diol ( $\pm$ )-trans-**55b**.

Debido a la experiencia existente en nuestro grupo de investigación nos hemos decantado por realizar esta protección por transesterificación con acetato de vinilo catalizada por Novozym® 435 (*Candida Antartica Lipase*)<sup>131</sup> obteniendo el derivado hemiacetilado **66**, con un rendimiento del 54%.

### 3.1.3. Sustitución directa de un grupo hidroxilo: reacción de Mitsunobu

#### 3.1.3.1. Obtención del benzoato de ( $\pm$ )-trans-3-[(*tert*-butildimetilsililo)metil]-1-indanilo (**60**)

La sustitución de alcoholes primarios o secundarios con nucleófilos mediada por una combinación redox de trialquil o triarilfosfina y diaquilazodicarboxilato es popularmente conocida como la reacción de Mitsunobu.

Desde su descubrimiento en 1967 por el profesor Oyo Mitsunobu,<sup>132</sup> la reacción ha tenido un papel privilegiado en síntesis orgánica debido a su estereoespecificidad y a las condiciones suaves en las que se lleva a cabo.

Además de ésteres, una amplia gama de compuestos que incluyen aminas, azidas, éteres, cianuros, tiocianuros, tioésteres y tioéteres pueden ser sintetizados utilizando esta reacción.<sup>133</sup>

Los sustratos son alcoholes primarios o secundarios. Cuando los alcoholes secundarios son quirales sufren una completa inversión de la configuración.

---

<sup>130</sup> a) Nishiguchi, T.; Fujisaki, S.; Ishii, Y.; Yano, Y.; Nishida, A. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1191. b) Leznoff, C. C. *Acc. Chem. Res.* **1978**, 11, 327. c) Kata, Y.; Fujiwara, Y.; Asano, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 3207. d) Lalonde, M.; Chan, T. H. *Synthesis* **1985**, 817.

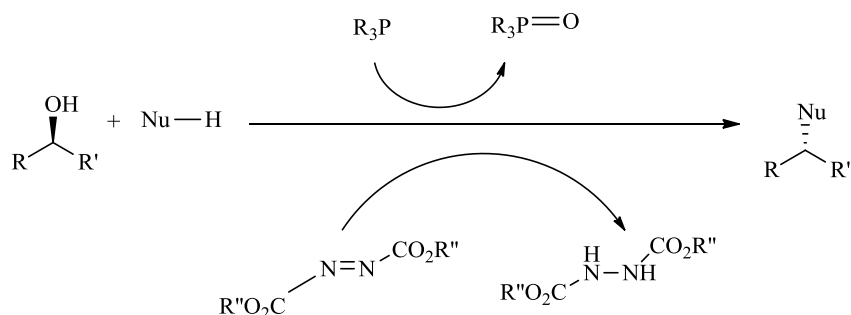
<sup>131</sup> Fernández, F.; García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron Asymm.* **2001**, 12, 365.

<sup>132</sup> Mitsunobu, O.; Yamada, Y. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1967**, 40, 2380.

<sup>133</sup> Swamy, K. C. K.; Bhuvan, K.; Balaraman, E.; Kumar, V. P. P. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2551.

Este aspecto ha sido ampliamente explotado en síntesis orgánica. En general, los alcoholes terciarios son menos reactivos a esta inversión de la configuración.<sup>134</sup>

El mecanismo de reacción es bastante complejo, quedando simplificado en el **esquema 19**:



**Esquema 19**

Por lo tanto, aplicando la metodología descrita por Mitsunobu, se sometió al compuesto **59** a un proceso de inversión de la configuración del átomo de carbono portador del grupo hidroxilo secundario por reacción con ácido benzoico en presencia de trifenilfosfina y dietilazadicarboxilato (DEAD), obteniéndose así el benzoato **60**, con un rendimiento del 75%.

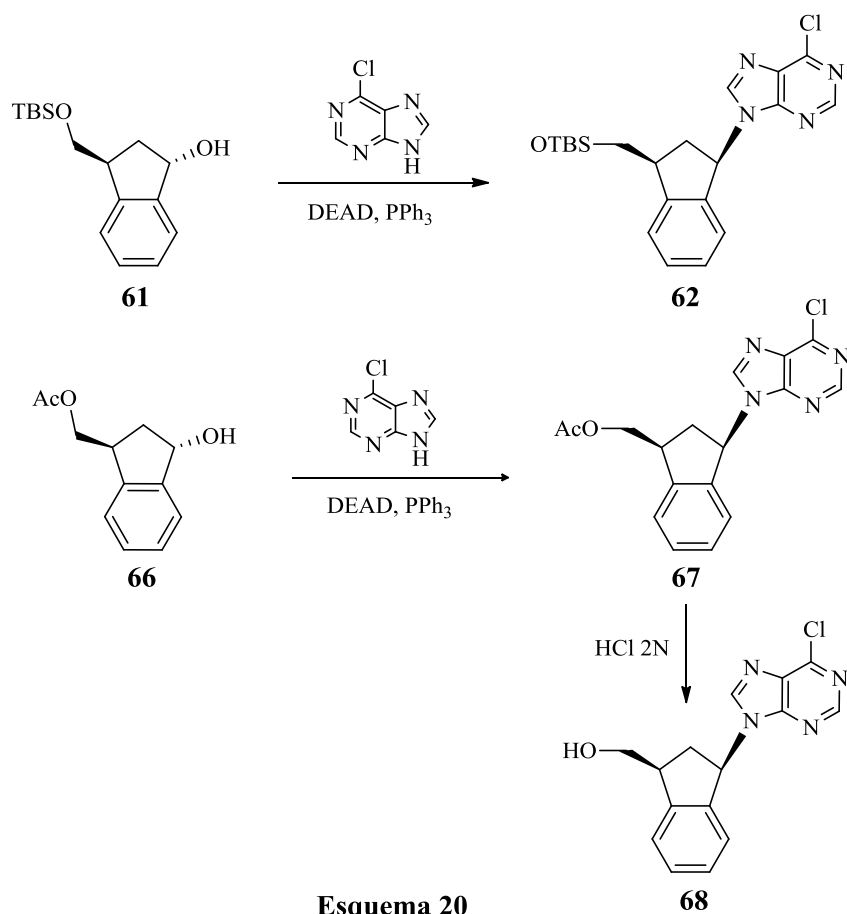
Este compuesto por tratamiento con metóxido sódico en metanol proporcionó el diol hemisililado **61**, con un rendimiento del 95%, con la disposición *trans* adecuada para llevar a cabo el proceso de acoplamiento de la 6-cloropurina en las condiciones de Mitsunobu.

#### 3.1.4. Síntesis de los derivados purícos

La introducción del agrupamiento 6-cloropurina se llevó a cabo por sustitución del alcohol primario del diol ( $\pm$ )-*trans*-hemisililado **61** o del diol ( $\pm$ )-*trans*-hemiacetilado **66**, vía reacción Mitsunobu, obteniéndose los respectivos derivados 6-cloropurínicos **62** y **67**, sililado y acetilado respectivamente.

A partir del compuesto **67** y por tratamiento con HCl 2N obtuvimos el correspondiente análogo 6-cloropurínico **68**, con la configuración *cis* adecuada (**Esquema 20**):

<sup>134</sup> Shi, Y.; Hughes, D. L.; McNamara, J. M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3609.



#### 3.1.4.1. Reacción de Sustitución Nucleófila Aromática. Síntesis de derivados 6-oxo, 6-cicloalquilamino y 6-metoxipurinilcarbanucleósidos

Dentro del importante grupo de agentes antineoplásicos y antileucémicos constituido por las bases púricas y sus derivados,<sup>135</sup> son numerosos y variados los ejemplos de nucleósidos de tipo aza y desazapurínicos con actividad citostática.<sup>136,137</sup>

La mayoría de estas modificaciones han mantenido, en la posición 6 de la base, el grupo oxo o amino, el cual es esencial para la formación de los enlaces de hidrógeno responsables de las interacciones con diferentes enzimas claves en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Sin embargo, esta actividad citostática fue también observada en diferentes arabinósidos derivados de la 6-metoxipurina<sup>138</sup> y en ciertos 6-alquilderivados de mercaptopurinas.<sup>139</sup>

<sup>135</sup> Robins, R. K.; Revankar, G. R. *Med. Res. Rev.* **1985**, 5, 273.

<sup>136</sup> Revankar, G. R.; Robins, R. K. *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*; Vol. 2. Townsend, L. B., Plenum Press, New York/London, **1988**, p200.

<sup>137</sup> Cristalli, G.; Franchetti, P.; Grifantini, M.; Vittori, S.; Bordoni, T.; Geroni, C. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 1686.

<sup>138</sup> Lambe, C. U.; Averett, D. R.; Paff, M. T.; Reardon, J. E.; Wilson, J.G.; Krenitsky, T. A. *Cancer Res.* **1995**, 55, 3352.

<sup>139</sup> Gibboney, D. S.; French, B. T.; Patrick, D. E.; Trewyn, R. W. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1989**, 25, 189.

De ahí que la presencia de sustituyentes, de diferente naturaleza en posición 6 de las purinas ejerza una amplia influencia en los niveles de actividad citostática.<sup>140</sup>

Entre los procedimientos sintéticos que permiten el desarrollo de derivados púricos 6-sustituídos está el empleo de la *Reacción de Sustitución Nucleófila Aromática* ( $S_NAr$ ).

La sustitución nucleófila sobre la posición 6-halogenada del anillo de purina transcurre mediante un mecanismo de adición-eliminación, produciéndose inicialmente un proceso de adición del nucleófilo sobre el átomo de carbono que soporta el átomo de cloro, a lo que sigue la eliminación del mismo (grupo saliente) en un segundo paso, completándose así la sustitución.<sup>141</sup> Derivados 6-oxo, 6-tio y 6-aminopurinilnucleósidos se pueden obtener mediante  $S_NAr$  de los átomos de halógeno en posición 6 de los nucleósidos púricos.

Es conocido que el orden de reactividad para reacciones de  $S_NAr$  sobre compuestos de tipo 1-halo-2,4-dinitrobenceno es  $F > Cl > Br > I$ . Sin embargo, este orden de reactividad se ha visto alterado en derivados de tipo 6-halopurinas.

Así Véliz y Beal<sup>142</sup> han descrito que los 6-bromopurinilnucleósidos son más reactivos que los correspondientes 6-cloropurinilderivados en reacciones de  $S_NAr$  con nucleófilos débiles de tipo arilaminas.

Recientemente Robins y cols.,<sup>143</sup> describieron que los 6-iodopurinilnucleósidos son más reactivos que sus correspondientes análogos clorados en reacciones de  $S_NAr$  con anilina.

La reactividad puede verse afectada por el tipo de disolvente empleado en la reacción. Véliz y Beal<sup>142</sup> describieron que diferentes 6-bromopurinil-carbanucleósidos reaccionaron sin dificultad con aminas aromáticas empleando metanol como disolvente de la reacción, a diferencia de la escasa reactividad mostrada con acetonitrilo como disolvente.

Se ha descrito, también, que la adición de TFA (2 equiv) aumenta la reactividad de los derivados halogenados frente a las reacciones de  $S_NAr$  con anilina logrando que el tiempo de reacción disminuya y que exista un cambio en el orden de reactividad siendo  $F > I > Cl > Br$ .<sup>144</sup>

En nuestro caso, la funcionalización de la posición 6 de la purina con grupos oxo, alquilamino y metoxi se realizó por tratamiento de **62** y **68** con el correspondiente nucleófilo. De esta forma el tratamiento de **62** con hidróxido sódico 0.25 N en 1,4-dioxano condujo al derivado de hipoxantina **63** con un rendimiento del 73%.

---

<sup>140</sup> Ishiguro, K.; Taira, S.; Sasaki, T.; Nariuchi, H. *J. Immunol. Methods* **1988**, *108*, 39.

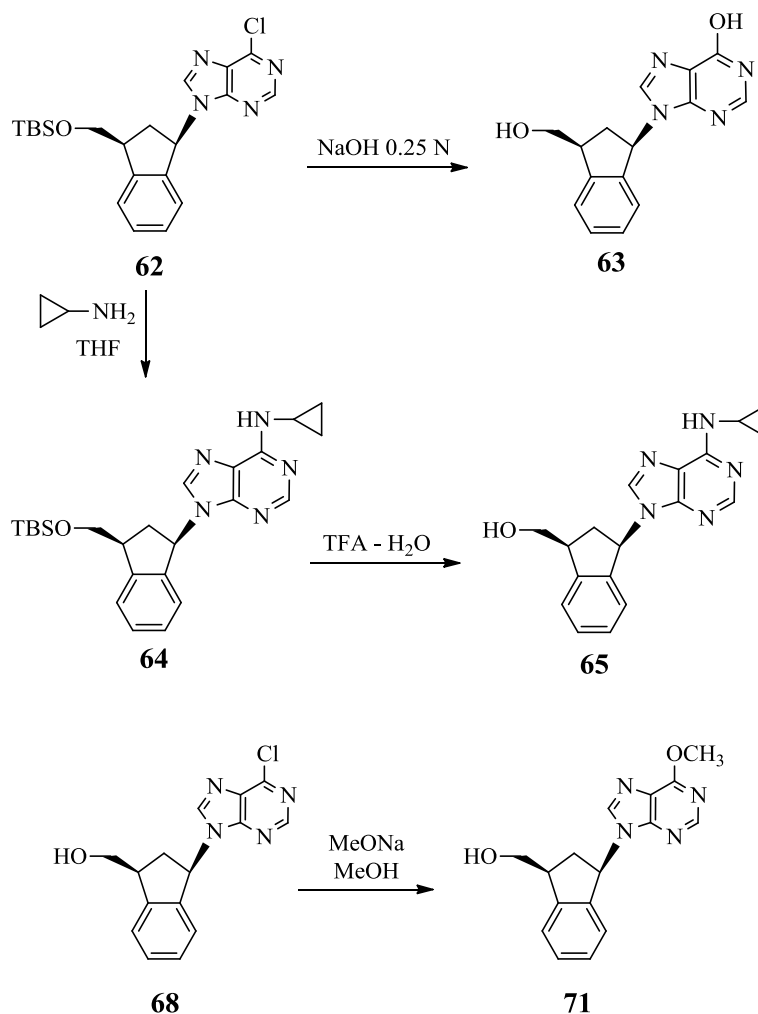
<sup>141</sup> Bernascosi, C. F. in *MTP Int. Rev. Sci., Organic Series One*, Vol. 3, H. Zollinger, Butterworths, London, **1973**.

<sup>142</sup> Vélaz, E. A.; Beal, P. A. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8592.

<sup>143</sup> Liu, J.; Janeba, Z.; Robins, M. J. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2917.

<sup>144</sup> Liu, J.; Robins, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5962.

El 6-*N*-ciclopropilpurinilderivado **65** se obtuvo, con un rendimiento del 42%, por reacción de **62** con *N*-ciclopropilamina en THF y posterior desprotección del grupo hidroxilo del compuesto resultante **64** con una mezcla de TFA-H<sub>2</sub>O en THF. Por otro lado, el 6-metoxiderivado **71** se obtuvo por tratamiento de **68** con metóxido sódico en metanol con un rendimiento del 99% (**Esquema 21**).



**Esquema 21**

#### 3.1.4.2. Reacción de Suzuki-Miyaura. Formación de derivados 6-arilpurínicos

Como hemos comentado en el apartado anterior, 3.1.4.1., la mayoría de las modificaciones realizadas sobre las bases púricas y sus nucleósidos para mejorar sus actividades antineoplásicas y antileucémicas, han mantenido, en la posición 6 de la base, el grupo oxo o amino.

Sin embargo, la actividad citostática también fue observada en nucleósidos sintéticos con grupos arilo en dicha posición,<sup>140</sup> conduciendo a su aplicación en diferentes terapias anticancerígenas.<sup>145</sup> En concreto, diversos ribonucleósidos derivados de 6-arilpurinas poseen una significativa actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares.<sup>146</sup>

Se puede recurrir a diferentes procedimientos para obtener este tipo de compuestos. Así, por ejemplo, se ha descrito el empleo de reacciones fotoquímicas radicalarias entre derivados de adenina y diversos compuestos aromáticos.<sup>147</sup>

Sin embargo este método es muy poco selectivo, y para el caso de anillos bencénicos sustituidos conduce a mezclas de derivados *orto*, *meta* y *para* de difícil separación.

Una posibilidad muy explorada en los últimos años consiste en la aplicación de reacciones de acoplamiento catalizadas por metales para la obtención de este tipo de purinas 6-sustituidas.<sup>148</sup> Así, para la preparación de derivados de tipo 6-aril o 6-alkilpurina se han utilizado reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio como la reacción de Suzuki-Miyaura.

#### Reacción de Suzuki-Miyaura:

Los complejos de paladio (0) son nucleófilos y bases fuertes y normalmente son utilizados para catalizar reacciones con halogenuros orgánicos, acetatos y triflatos. Las reacciones catalizadas por paladio que permiten el acoplamiento entre un derivado organoborano (ácido borónico o éster de un ácido borónico) y un electrófilo orgánico (halogenuro orgánico o triflato) son denominadas *Reacciones de Acoplamiento de Suzuki o Acoplamientos Suzuki-Miyaura*<sup>107</sup> y permiten la formación de enlaces C-C.

La metodología de los acoplamientos de Suzuki ha sido aplicada a la síntesis de muchos compuestos orgánicos,<sup>149</sup> especialmente en la preparación de productos naturales complejos, heterociclos y en química supramolecular. Principalmente, se emplea en la obtención de biarilos<sup>146,150</sup> y en el acoplamiento de haluros o triflatos de alqueno o arilo con ácidos alquil, alquenoil o arilborónicos (**Esquema 22**).

---

<sup>145</sup> Parker, W. B.; King, S. A.; Allan, P. W.; Bennett, L. L.; Secrist, J. A. *Hum. Gene Ther.* **1997**, 8, 1637.

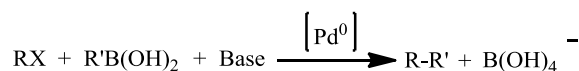
<sup>146</sup> Hocek, M.; Holý, A.; Votruba, I.; Dvoraková, H. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1817.

<sup>147</sup> a) Nair, V.; Richardson, S. G.; Goffman, R. E. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 4520. b) Nair, V.; Young, D. A. *J. Org. Chem.* **1984**, 49 (23), 4340.

<sup>148</sup> Agrofoglio, L. A.; Gillaizeu, I.; Saito, Y. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 1875.

<sup>149</sup> Mallaron, J. L.; Fiaud, J. C.; Legros, J. Y. *Handbook of Palladium-Catalyzed Organic Reactions*; Academia Press, San Diego, **1997**.

<sup>150</sup> Sambasivarao, K.; Lahiri, K.; Kashinath, D. *Tetrahedron* **2002**, 58, 9633.



### Esquema 22

La reacción no se ve afectada por la presencia de agua, es compatible con una amplia diversidad de grupos funcionales y transcurre generalmente con regio y estereoselectividad.<sup>151</sup>

Un ejemplo de síntesis de derivados de biarilos utilizando los ácidos arilborónicos fue publicado en 1981.<sup>152</sup> La combinación de catalizadores de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0),  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$  o cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II),  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  y una disolución de carbonato sódico en dimetoxietano funciona bien en la mayoría de los casos.<sup>153,154</sup> Otras bases como trietilamina, bicarbonato sódico, carbonato de cesio, carbonato de talio y fosfato potásico también se suelen emplear.

La reacción puede llevarse a cabo en condiciones homogéneas (carbonato sódico en una mezcla de dimetoxietano/agua) o bien en condiciones heterogéneas (carbonato potásico en tolueno). Generalmente las primeras son más rápidas, aunque las condiciones heterogéneas permiten llevar a cabo acoplamientos con reactivos sensibles a bases.<sup>155</sup>

Aunque los efectos estéricos de los haluros de arilo constituyen el factor principal que condiciona la formación de biarilos sustituidos, cuando se emplean ácidos borónicos con sustituyentes en posición *orto*, los rendimientos suelen ser bajos. En estos casos, para evitar dicha falta de reactividad, se emplean bases fuertes, como hidróxido sódico acuoso o hidróxido bórico en benceno o dimetoxietano.<sup>156</sup> Las bases débiles funcionan mejor en acoplamientos con derivados borónicos sin impedimentos estéricos.

Suzuki ha propuesto un ciclo catalítico para el acoplamiento de organoboranos y electrófilos orgánicos.<sup>107</sup> Este ciclo conlleva, inicialmente, la adición oxidante de los haluros orgánicos al complejo de paladio (0) para formar organopaladio (**Ar-Pd-X**).

Este paso es seguido del desplazamiento del ión haluro de **Ar-Pd-X** por especies básicas para dar un alcóxido de organopaladio (**Ar-Pd-OR**) o hidróxido de organopaladio (**Ar-Pd-OH**), dependiendo de la base usada.

<sup>151</sup> Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457.

<sup>152</sup> Miyaura, N.; Yanagi, A.; Suzuki, A. *Synth. Commun.* **1981**, 11, 513.

<sup>153</sup> Gronowitz, S.; Bobosik, V.; Lawitz, K. *Chem. Scr.* **1984**, 23 (3), 120.

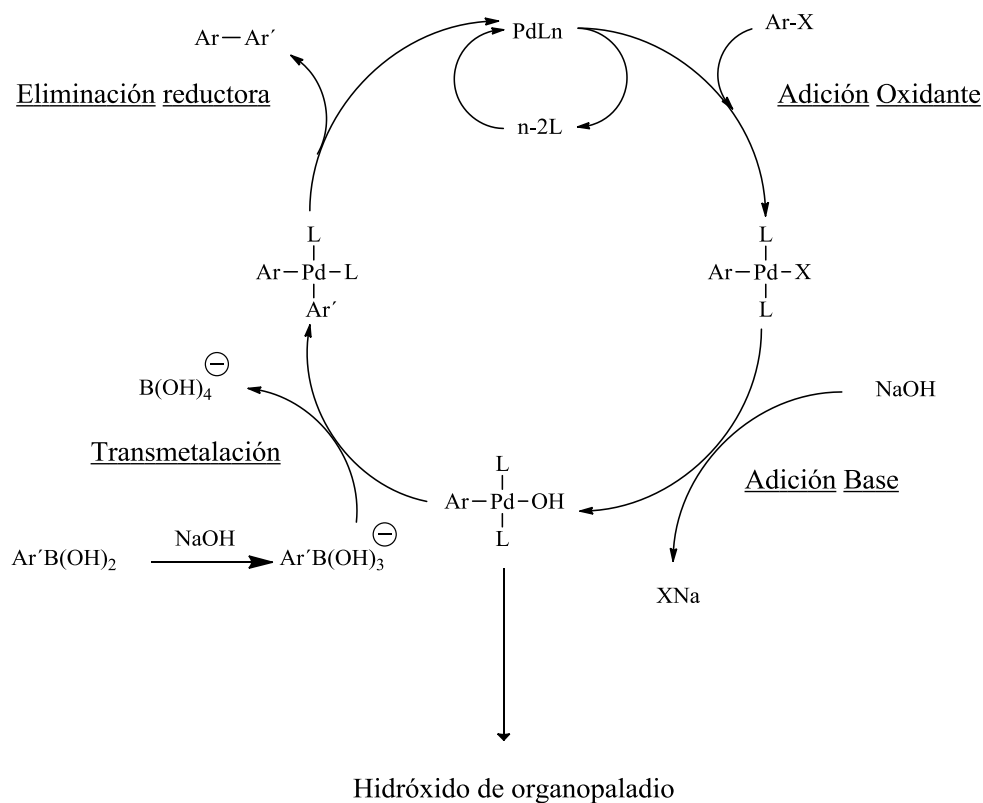
<sup>154</sup> Alo, A. B. I.; Kandil, P. A.; Patil, M. J.; Sharp, M. A.; Siddiqui, V.; Snieckus, P. D. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 3763.

<sup>155</sup> Shieh, W. C.; Carlson, J. A. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 379.

<sup>156</sup> a) Watanabe, T.; Miyaura, N.; Suzuki, A. *Synlett* **1992**, 3, 207. b) Guillier, F.; Nivoliens, F.; Godard, A.; Marsais, G.; Guéniguer, G. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 6489.



Estos alcóxidos e hidróxidos de organopaladio, al parecer, son más reactivos que el haluro del mismo. Posteriormente, continúa un proceso de transmetalación para dar el complejo de diorganopaladio ( $\text{Ar-Pd-Ar'}$ ) que mediante la eliminación reductora (este proceso no es más que el contrario a la adición oxidante) permite la formación de un enlace C-C, en este caso el derivado de biarilo, y la regeneración del catalizador (**Esquema 23**).



**Esquema 23**

Como se muestra en el esquema para que transcurra el ciclo catalítico son necesarios dos equivalentes de base. Un equivalente es utilizado en la formación del boronato, lo cual es consecuente con el hecho de que los ácidos borónicos actúan como ácidos de Lewis.<sup>157</sup> El segundo equivalente de base es consumido para formar el hidróxido de organopaladio.

Obviamente, el hidróxido de organopaladio debería ser más reactivo que el haluro de organopaladio, dado que el enlace Pd-O es más polar que el enlace Pd-Br. Como consecuencia de la mayor electrofilia del hidróxido de organopaladio, la reacción de transmetalación se ve facilitada.<sup>158</sup>

<sup>157</sup> Lorand, J. P.; Edwards, J. O. *J. Org. Chem.* **1959**, 24, 769.

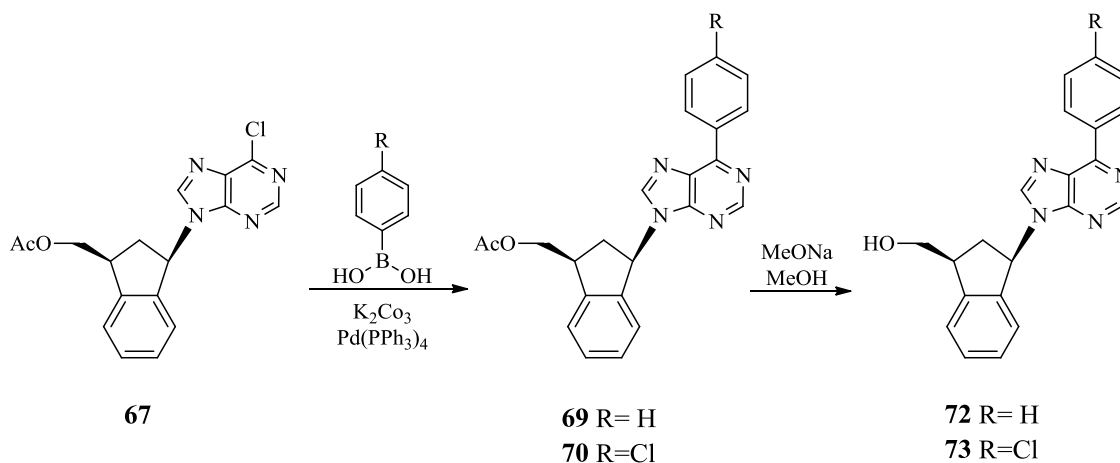
<sup>158</sup> Martin, A. R.; Yang, Y. *Acta Chem. Scandinavica* **1993**, 47, 221.

Así, esta reacción ha sido usada frecuentemente en el campo de la química de nucleósidos,<sup>148</sup> concretamente en lo que se refiere a la introducción de modificaciones sobre la base heterocíclica. En este contexto, Robins y cols.,<sup>143</sup> han reportado un método para la conversión de derivados de 6-cloropurina en los correspondientes 6-yodo derivados mediante una reacción de Finkelstein (intercambio de halógeno) modificada.

Así mismo, dichos autores afirman que esta conversión aumenta la reactividad del derivado halogenado de purina en reacciones de acoplamiento catalizadas por Pd.

En el año 2001, Hocek<sup>159</sup> describió el uso de la reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura de 6-halopurinas con ácidos borónicos que había aplicado, con éxito, a la síntesis de bases tipo 6-aryl purinas y análogos de nucleósidos acíclicos,<sup>160</sup> los cuales presentaron una significativa actividad antineoplásica.

En nuestro caso concreto, hemos preparado los 6-aryl purinilcarbanucleósidos **72** y **73** por tratamiento del compuesto **67** con ácido 6-fenilborónico y ácido 6-clorofenilborónico, respectivamente, obteniendo los compuestos hemiacetilados **69** y **70** cuyo tratamiento con metóxido sódico en metanol rindieron los análogos finales **72** y **73** (Esquema 24).



Esquema 24

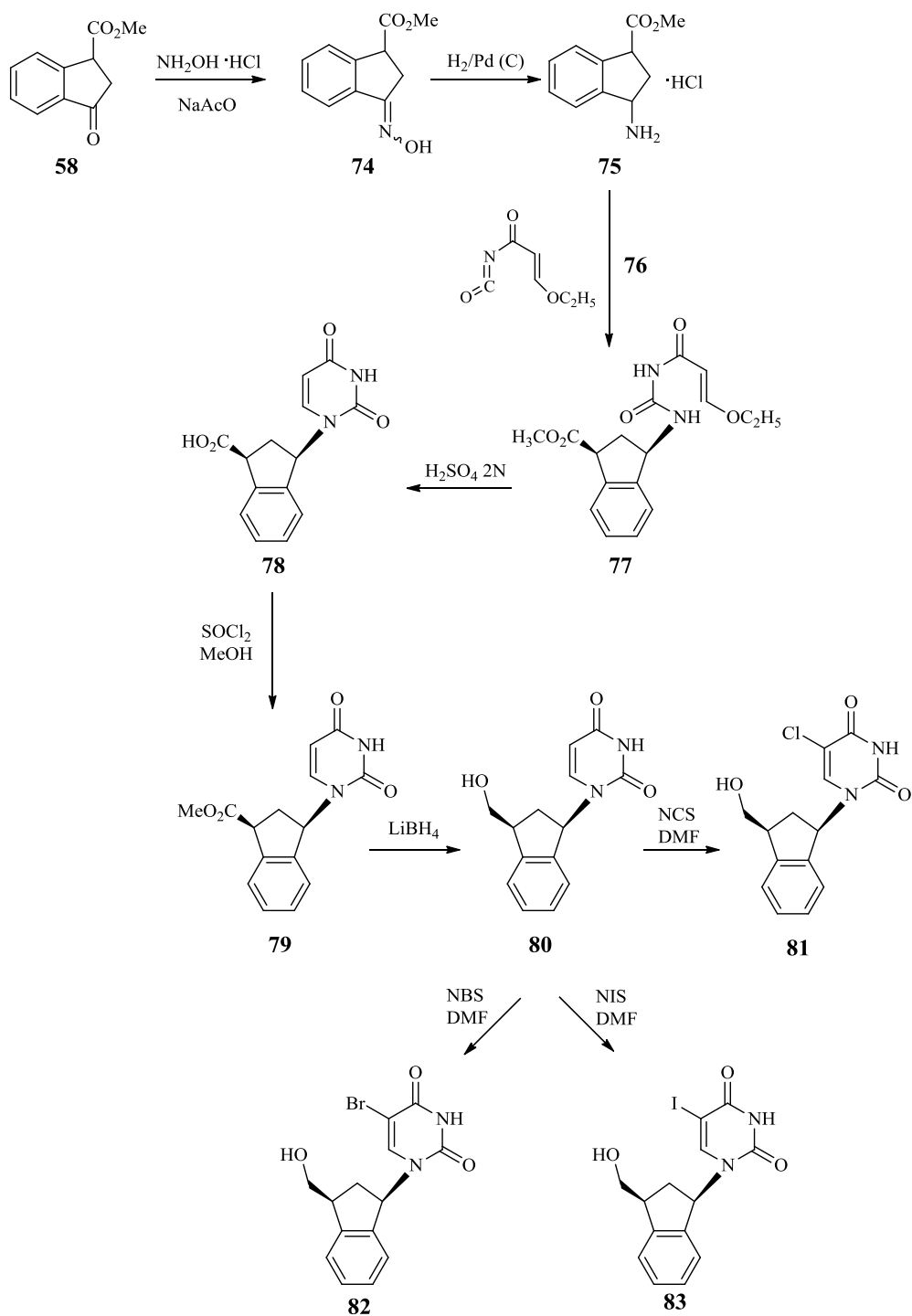
### 3.1.5. Síntesis de derivados pirimidínicos

Para evitar el laborioso proceso de la inversión de la configuración decidimos optar por la utilización de la primera de las estrategias sintéticas, es decir construir la base sobre el grupo amino del correspondiente aminoalcohol o precursor equivalente. Para ello en una primera etapa

<sup>159</sup> Havelková, M.; Dvorak, D.; Hocek, M. *Synthesis* **2001**, 1704.

<sup>160</sup> Cesnek, M.; Hocek, M.; Holý, A. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, 65, 1357.

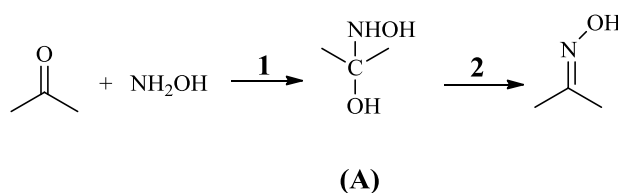
debemos preparar el clorhidrato **75**, y a continuación construir sobre su grupo amino el anillo de uracilo. La estrategia sintética completa queda reflejada en el **esquema 25**:



Esquema 25

### 3.1.5.1. Síntesis y reducción de oximas. Obtención del clorhidrato de ( $\pm$ )-*cis*-3-amino-1-indanocarboxilato de metilo (**75**).

Las oximas se pueden preparar por adición de hidroxilamina, o derivados de ésta, sobre aldehídos o cetonas.<sup>161</sup> Jencks<sup>162</sup> demostró que el rendimiento de este tipo de reacciones depende decisivamente del pH del medio, siendo máximo a un pH próximo a 4 y disminuyendo los rendimientos a pH inferior. El proceso de formación de la oxima se puede visualizar en dos etapas (**Esquema 26**):



**Esquema 26**

A bajos valores de pH la etapa 2 es rápida (porque está catalizada en medio ácido) y la 1 lenta (determina la velocidad de reacción), ya que bajo estas condiciones ácidas la mayor parte de las moléculas de  $\text{NH}_2\text{OH}$  están protonadas ( $\text{NH}_3\text{OH}^+$ ) y no pueden atacar al sustrato. A medida que aumentamos el pH la fracción de  $\text{NH}_2\text{OH}$  libre aumenta también y consecuentemente la velocidad y rendimiento de la reacción, hasta un máximo que se sitúa entorno a pH 4. El intermedio (A) del proceso anterior se detectó por RMN en la reacción entre acetaldehído e hidroxilamina.

En nuestro caso, concreto, por reacción de una disolución etanólica de **58** con hidroxilamina, liberada *in situ* por tratamiento básico de clorhidrato de hidroxilamina, obtuvimos la mezcla de oximas *syn* y *anti*-(3-hidroxiimino)-1-indanocarboxilato de metilo (**74**), en una proporción 60:40. A continuación realizamos la reducción de la mezcla de oximas utilizando hidrógeno y Pd/C al 10% como catalizador en presencia de una pequeña cantidad de cloroformo,<sup>163</sup> con el objeto de obtener el aminoéster en forma de clorhidrato, producto sólido mucho más estable que la base libre. Esta reacción fue llevada a cabo en un reactor a 60 bares de presión y a una temperatura de 50°C durante 3 horas. En estas condiciones obtuvimos **75**, con un rendimiento del 90%. La obtención única del aminoéster con disposición *cis* evita el complejo proceso de separación de los dos racematos isómeros, *cis* y *trans*, que se obtienen cuando se realiza el proceso de reducción a temperatura ambiente y a una presión inferior, como

<sup>161</sup> Sandler, S. R.; Karo, W. *Organic Functional Group Preparations*, Acedamic Press, New York, **1972**, p372.

<sup>162</sup> Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 475.

<sup>163</sup> Secrist, J. A.; Logue, M. W. *J. Org. Chem.* **1972**, 37 (2), 335.

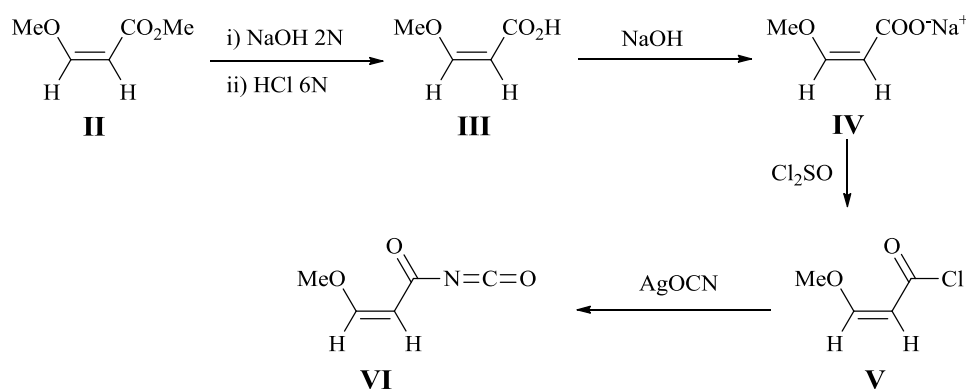
tenemos comprobado en experiencias anteriores llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación.<sup>164</sup>

### 3.1.5.2. Construcción del anillo pirimidínico. Obtención de (±)-cis-1-(3-hidroximetil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (**80**).

Una vez sintetizado el clorhidrato de (±)-cis-3-amino-1-indanocarboxilato de metilo (**75**), debemos realizar el proceso de construcción de la base pirimidínica sobre el grupo amino, con el fin de preparar los carbanucleósidos pirimidínicos deseados. Para ello decidimos aplicar la metodología de Shaw.<sup>109,110</sup>

Con las primeras síntesis de carbanucleósidos derivados de timidina<sup>165</sup> o de uracilo<sup>166</sup> quedó comprobado que la presencia de grupos hidroxilo libres no era obstáculo para la reacción selectiva de los reactivos isocianatos de acrilóilo con aminoalcoholes, siempre que la reacción tuviera lugar en DMF a baja temperatura.

La realización de todo este proceso descansa en la asequibilidad del sensible isocianato **VI**, el cual debe ser obtenido inmediatamente antes de su utilización a partir de cianato de plata y del correspondiente cloruro de β-alcoxiacrilóilo, **V**, el cual, por la vía clásica, necesitaba de un proceso preparativo un tanto laborioso (**Esquema 27**).



Esquema 27

Sin embargo, recientemente Tietze y cols.<sup>167</sup> han puesto a punto un método alternativo, mucho más eficaz y económico para la preparación de cloruros de tipo **V**. La adición nucleófila de alquil o aril vinil éteres al cloruro de oxalilo según el proceso de Effenberger,<sup>168</sup> conduce a

<sup>164</sup> Fernández, F.; García-Mera, X.; Morales, M.; Rodríguez-Borges, J. E. *Synthesis* **2001**, 2, 239.

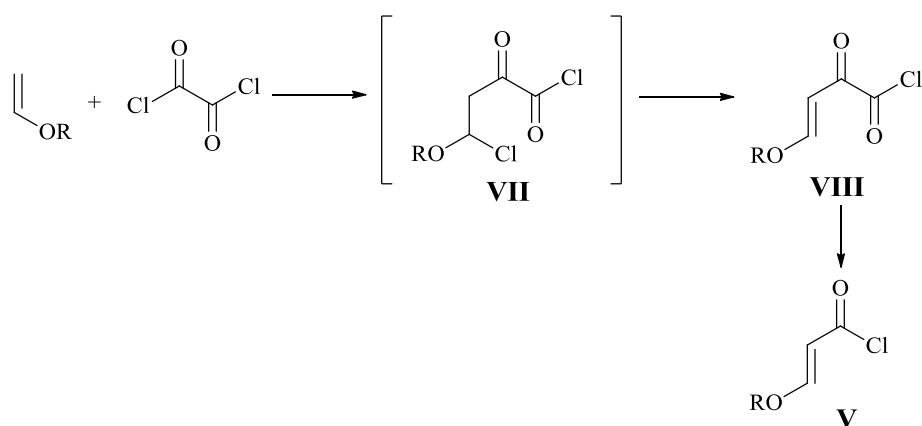
<sup>165</sup> Shealy, Y. F.; O'Dell, C. A. *J. Heterocycl. Chem.* **1976**, 13, 1015.

<sup>166</sup> Shealy, Y. F.; O'Dell, C. A.; Thorpe, M. C. *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, 18, 383.

<sup>167</sup> Tietze, L. F.; Schneider, C.; Pretor, M. *Synthesis*, **1993**, 1079.

<sup>168</sup> Effenberger, F. *Chem. Ber.* **1965**, 98, 450.

temperatura ambiente vía **VII**, a un cloruro de un  $\alpha$ -cetoácido, **VIII**, que se descarbonila suavemente por calefacción a temperaturas cercanas a 100°C para generar los cloruros de (*E*)-3-alcoxi y (*E*)-3-fenoxiacrilóilo. De esta manera, basta someter directamente **VIII** sin purificar a un proceso de destilación para obtener los cloruros de ácido **V** puros (**Esquema 28**).



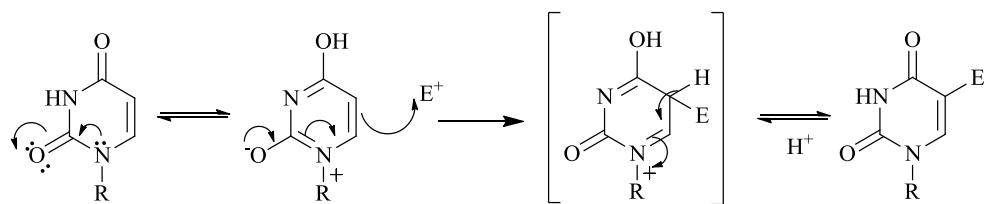
Así hicimos reaccionar **75** con isocianato de 3-etoxi-2-propenoílo (**76**), recién preparado, en dimetilformamida, obteniendo ( $\pm$ )-*cis*-*N*-(3-metoxycarbonil-1-indanil)urea (**77**), con un rendimiento del 77%.

La ciclación del derivado **77** se llevó a cabo con ácido sulfúrico 2N. En esta reacción tiene lugar un doble proceso: por un lado obtenemos el anillo pirimidínico buscado y por otro lado se provoca la hidrólisis del grupo éster obteniéndose un grupo ácido, con lo que, finalmente obtenemos el compuesto ( $\pm$ )-*cis*-1-(3-hidroxicarbonil-1-indanil)-1,2,3,4,-tetrahidropirimidino-2,4-diona (**78**), con un rendimiento del 99%. Este compuesto fue transformado en el análogo de uracilo **80** mediante un proceso de esterificación, con cloruro de tionilo y metanol, y posterior reducción del éster metílico formado con hidruro de litio y boro.

#### 3.1.5.3. Obtención de 5-halopirimidinilcarbanucleósidos **81**, **82**, **83**.

Finalmente, preparamos tres nuevos derivados halogenados, en la posición 5 del anillo de pirimidina, del carbanucleósido **80**. La sustitución electrófila en el anillo de uracilo suele tener lugar en la posición C-5. La reactividad se ve mermada por los átomos de nitrógeno de las posiciones 1 y 3.

Sin embargo, la presencia de sustituyentes electrodonadores en posición 2 ó 4 provoca un incremento de la densidad electrónica en C-5 y potencia la reactividad del anillo frente a reactivos electrófilos, lo cual explica la facilidad de la halogenación en C-5 de los análogos de uridina. (**Esquema 29**).



Esquema 29

Existen numerosos métodos de halogenación de derivados pirimidínicos que difieren en función del halógeno a introducir. Para la preparación de los 5-clorouracilo derivados, los métodos más habituales consisten en utilizar cloro elemental en ácido acético,<sup>169</sup> *N*-clorosuccinimida en ácido acético<sup>170</sup> o cloroformo.<sup>171</sup>

Se han descrito también otros procedimientos utilizando reactivos como ácido *m*-cloroperbenzoico y cloruro de hidrógeno<sup>172</sup> o dicloruro de yodobenceno en ácido acético.<sup>173</sup> Respecto a la bromación se ha utilizado bromo en ácido acético,<sup>174</sup> *N*-bromosuccinimida en ácido acético,<sup>170</sup> en DMF<sup>175</sup> o en cloroformo.<sup>171</sup> Por último para la yodación los métodos habituales son yodo/ácido nítrico en dioxano,<sup>176</sup> *N*-yodosuccinimida en ácido acético<sup>170</sup> o cloruro de yodo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.<sup>173</sup> Los 5-halo derivados de 1-alquiluracilos, ya tienen interés por sí mismos en base a su potencial actividad biológica,<sup>177</sup> o como intermediarios sintéticos para la consecución de por ejemplo los 5-bromovinil derivados.<sup>178</sup>

En nuestro caso, la halogenación fue llevada a cabo por tratamiento de **80** con la *N*-halosuccinimida correspondiente en el seno de dimetilformamida.<sup>179</sup> Los rendimientos obtenidos en la preparación de los derivados bromado e iodado fueron buenos, 73 y 60%, respectivamente. Sin embargo, en el proceso de cloración, a pesar de los diferentes intentos realizados, variando la cantidad de NCS, el tiempo de reacción y la temperatura, el rendimiento no superó el 25%.

<sup>169</sup> Visser, D. W.; Fritsch, D. M.; Huang, B. *Biochem. Pharmacol.* **1960**, 5, 157.

<sup>170</sup> Awano, H.; Shuto, S.; Baba, M.; Kira, T.; Shigeta, S.; Matsuda, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 367.

<sup>171</sup> Nishiwaki, T. *Tetrahedron* **1966**, 22, 2401.

<sup>172</sup> Ryu, E. K.; MacCoss, M. *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 2819.

<sup>173</sup> Robins, J. M.; Barr, P. J.; Giziewick, J. *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 554.

<sup>174</sup> Lin, T.; Chen, M. S.; McLaren, C.; Gao, Y.; Ghazzouli, I.; Prusoff, H. W. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 440.

<sup>175</sup> Srivastava, P. C.; Nagpal, K. L. *Experientia* **1970**, 26, 220.

<sup>176</sup> Prusoff, W. H.; Colmes, W. L.; Welch, A. D. *Cancer Res.* **1953**, 13, 221.

<sup>177</sup> Shealy, Y. F.; O'Dell, C. A.; Shannon, W. M.; Annett, G. *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 156.

<sup>178</sup> Herdewijn, P.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Vanderhoeghe, H. *J. Med. Chem.* **1985**, 32, 1861.

<sup>179</sup> Sako, M.; Saito, K.; Kameyama, K.; Hirota, K.; Maki, Y. *Synthesis* **1987**, 829.





#### ***4. QUÍMICA: PARTE EXPERIMENTAL***



#### 4. QUÍMICA: PARTE EXPERIMENTAL

##### 4.1. ASPECTOS GENERALES

a. Los puntos de fusión se determinaron en una platina KOFLER THERMOPAN REICHERT y no están corregidos.

b. Todos los compuestos fueron objeto de un estudio rutinario por espectrofotometría de IR, empleando un espectrofotómetro PERKIN-ELMER 1640 FTIR, en película sobre NaCl (líquidos) o en pastillas de KBr (sólidos) o el espectrofotómetro JASCO FT/ IR-4100 provisto de un accesorio ATR (*Attenuated Total Reflection*, Reflexión Total Atenuada) para la aplicación de muestras. Se indican las bandas más intensas y características de cada compuesto expresando su número de onda en  $\text{cm}^{-1}$ .

c. Los espectros de RMN se registraron en aparatos BRUKER AMX (300 MHz para  $^1\text{H}$  y 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) y BRUKER DMX (500 MHz para  $^1\text{H}$ ), a temperatura ambiente en  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\text{TFA}-d_4$ ,  $\text{MeOH}-d_4$ , o  $\text{D}_2\text{O}$  según los casos y usando la señal del TMS o la del propio disolvente no totalmente deuterado como referencia interna.

Se indican los desplazamientos en ppm (escala  $\delta$ ), correspondientes a señales individuales bien resueltas o al intervalo en el que aparecen cuando corresponden a varias señales y/o a multipletes complejos, seguido de la multiplicidad de la señal (s = singlete; d = doblete; t = triplete; c = cuadruplete; quint = quintuplete; m = multiplete; dd = doble doblete; ddd = doble doblete de dobletes; dt = doble de triplete; dc = doble cuadruplete; s.an = señal ancha; ap = aparente), del número de protones (deducido de la integración), constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hertzios (Hz) y de la asignación estructural cuando es clara.

d. Los espectros de masas con sistema de ionización por impacto electrónico (IE) se realizaron en un espectrómetro de masas cuadrupolar HEWLETT-PACKARD 5988A y los de bombardeo con átomos rápidos (BAR) en un espectrómetro MICROMASS AUTOSPEC.

e. Los datos de difracción de Rayos X se recogieron en difractómetros ENRAF NONIUS CAD4 y BRUKER-NONIUS FR591-KAPPA CCD2000 utilizando como tratamiento de datos el programa CAD4-EXPRESS.

f. Los microanálisis se realizaron en un analizador elemental CARLO ERBA, modelo EA 1108.

g. Las actividades ópticas se midieron en un polarímetro PERKIN-ELMER 241, expresando la rotación específica en  $(^\circ) (\text{dm})^{-1} (\text{g})^{-1} (\text{mL})$ .

**h.** La separación de compuestos por cromatografía en columna (CC) se realizó empleando como adsorbente gel de sílice flash SDS tipo 60 A C.C, tamaño de partícula 35-70 micrones.

**i.** Para la realización de la cromatografía analítica en capa fina (CCF) se emplearon cromatofolios de gel de sílice TLC 60 F<sub>254</sub>, MERCK, espesor de capa 0.2 mm, utilizando como reveladores luz UV (254-360 nm) y/o ácido fosfomolibdico.

**j.** En las purificaciones por destilación se utilizó un horno de bolas BUCHI B580.

**k.** Para las evaporaciones bajo presión reducida se utilizó un rotavapor RESONA 300 conectado a una trompa de agua.

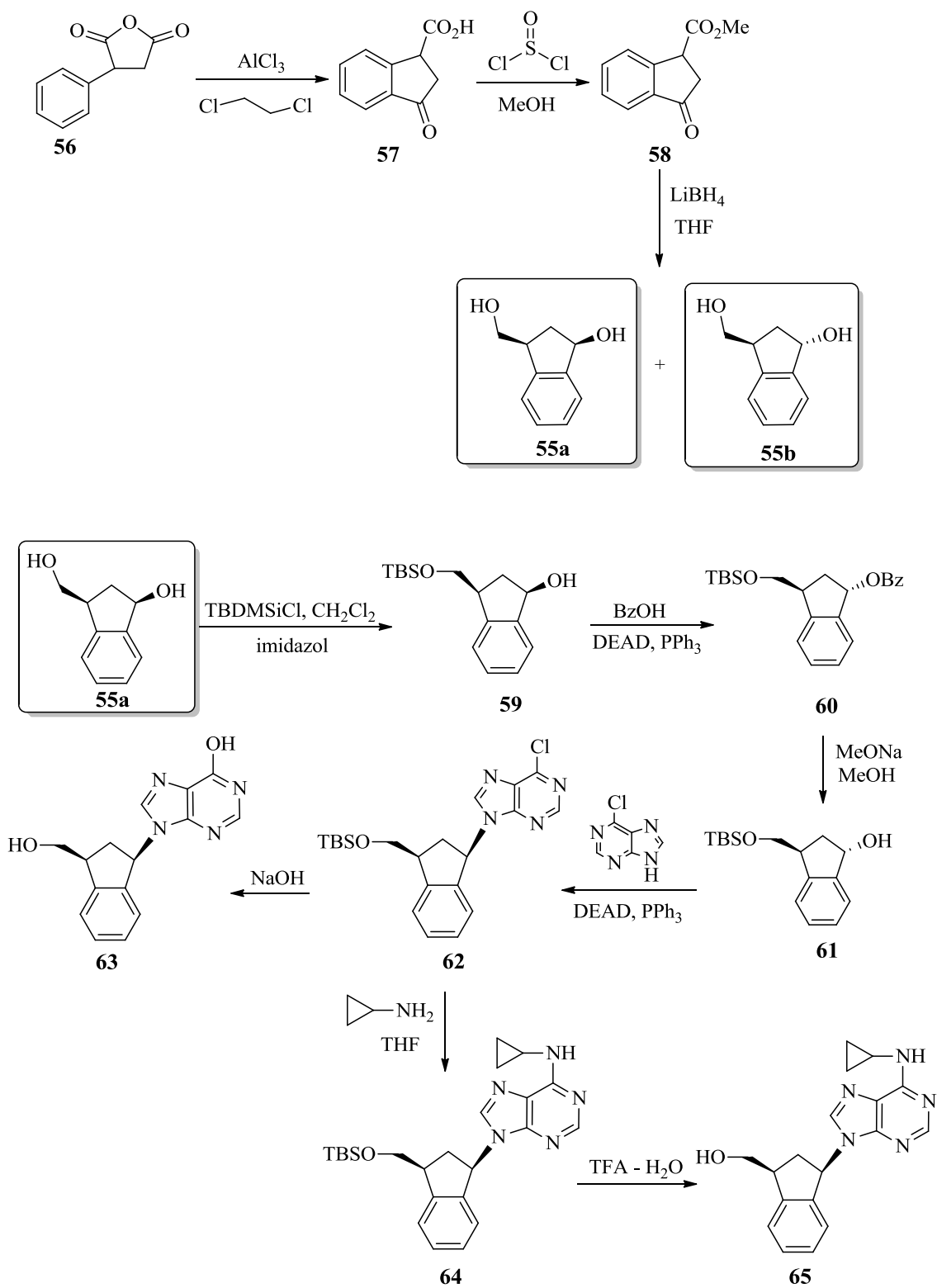
**l.** Para enfriar a temperaturas entre  $-60^{\circ}\text{C}$  y  $-78^{\circ}\text{C}$  se empleó un cryocool HAAKE FISONS EK 101.

**m.** Los disolventes utilizados se purificaron siguiendo los procedimientos descritos por Vogel<sup>180</sup> y cuando se necesitaron anhidros, se secaron por destilación sobre un agente desecante adecuado, bajo atmósfera inerte de argón inmediatamente antes de ser utilizados.

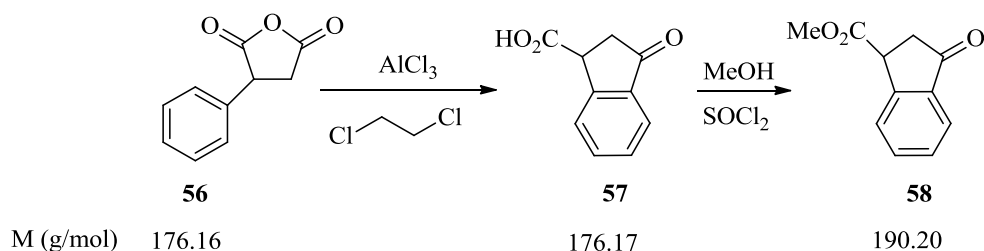
Los agentes desecantes utilizados fueron: Na/benzofenona para THF, Et<sub>2</sub>O, hexano, dioxano, benceno y tolueno; presecado con CaO y después Mg/I<sub>2</sub> para el MeOH y EtOH; presecado con CaCl<sub>2</sub> anhidro y Mg/I<sub>2</sub> para el *n*-butanol; KOH para trietilamina y piridina; filtros moleculares para el *t*-BuOH y DMF y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>CN.

---

<sup>180</sup> Vogel, A. I. *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5<sup>th</sup> edition, Longman Scientific and Technical, London, **1989**, 395p.



#### 4.2. 3-Oxo-1-indanocarboxilato de metilo (58).



Sobre una suspensión bien agitada de tricloruro de aluminio (38.40 g; 282.37 mmol) en 1,2-dicloroetano (100 mL) a 0°C se añadió, gota a gota, una solución de anhídrido fenilsuccínico (22.60 g; 128.35 mmol) en 1,2-dicloroetano (80 mL). La solución resultante se agitó 20 minutos a 0°C y posteriormente 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se trató la solución con hielo. Seguidamente se extrajo con éter etílico (3 x 100 mL) y las capas orgánicas se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Por eliminación a vacío del disolvente se obtuvo el ácido 3-oxo-1-indanocarboxílico, **57**, (19.33 g; Rdto. 85.5%) en forma de aceite rojo que espontáneamente cristaliza como un sólido marrón.

**Compuesto ( $\pm$ ) 57:** Sólido marrón, p.f. 114-116°C.

**IR (KBr)  $\nu$**  = 3364, 3019, 2928, 1720, 1692, 1598, 1465, 1293, 1190  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 11.50 (s.a., 1H, OH, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 7.80-7.74 (m, 2H, 4-H, 7-H), 7.64 (q, 1H, 6-H), 7.45 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz, 5-H), 4.32 (m, 1H, 1-H), 3.14 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 19.2$  Hz,  $J_{\text{vec}} = 3.5$  Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.90 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 19.0$  Hz,  $J_{\text{vec}} = 8.0$  Hz, 2 $\beta$ -H).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 204.41 (C), 172.60 (C), 151.43 (C), 136.73 (C), 135.36, 129.20, 126.89 y 124.32 (CH), 43.99 (CH), 39.88 ( $\text{CH}_2$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$  (176.17): C 68.18, H 4.58; encontrado C 67.97, H 4.65.

El cetoácido **57** (6.50 g; 36.89 mmol), sin purificar, se disolvió en metanol (60 mL), bajo atmósfera de argón, y a 0°C se añadió cloruro de tionilo (4 mL; 55.34 mmol). Se dejó agitando a temperatura ambiente durante 14 horas, transcurridas las cuales se rotó para eliminar el exceso de disolvente. Tras esto, se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (240 g) empleando como eluyente Hexano/ $\text{AcOEt}$  (11:1), obteniéndose como resultado un aceite que espontáneamente cristaliza como un sólido amarillento (5.60 g; Rdto. 86%).

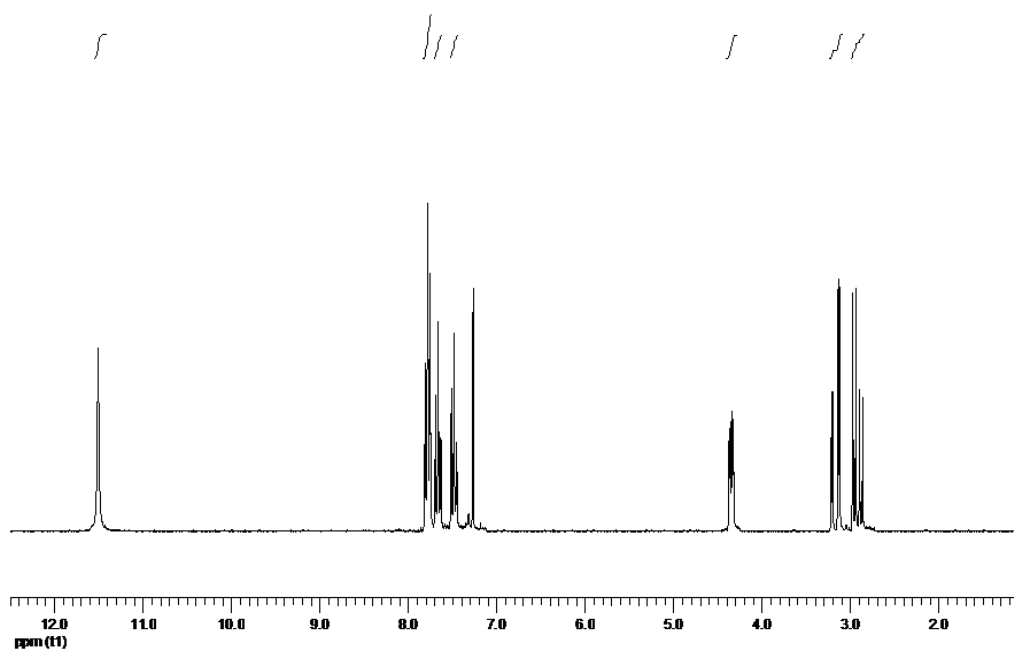
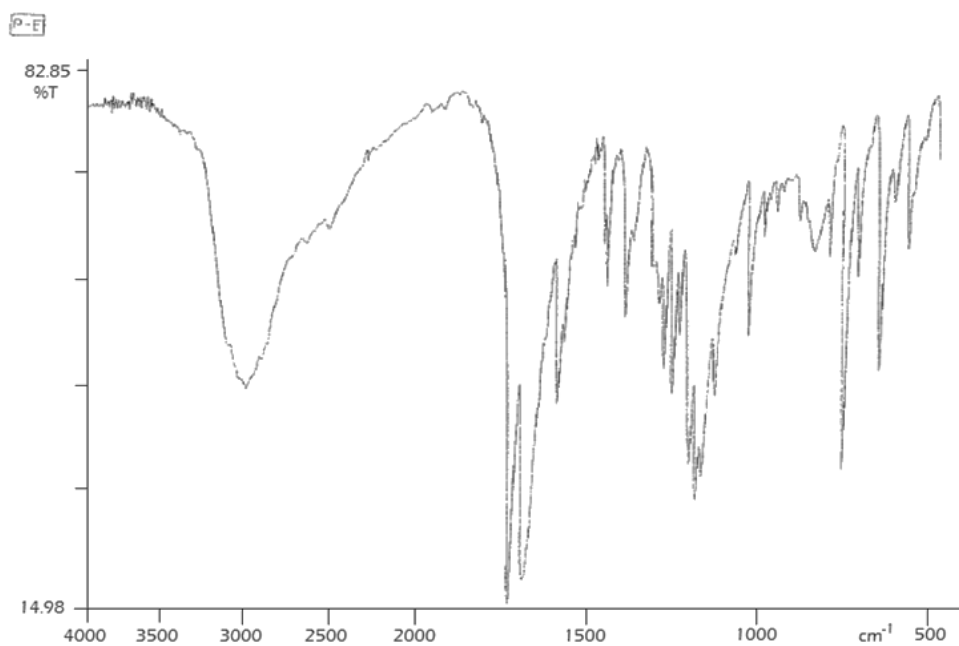
**Compuesto (±) 58:** Sólido amarillo, p.f. 41-43°C.

**IR (KBr)**  $\nu$  = 3009, 2954, 1736, 1654, 1598, 1342, 1209, 1170  $\text{cm}^{-1}$

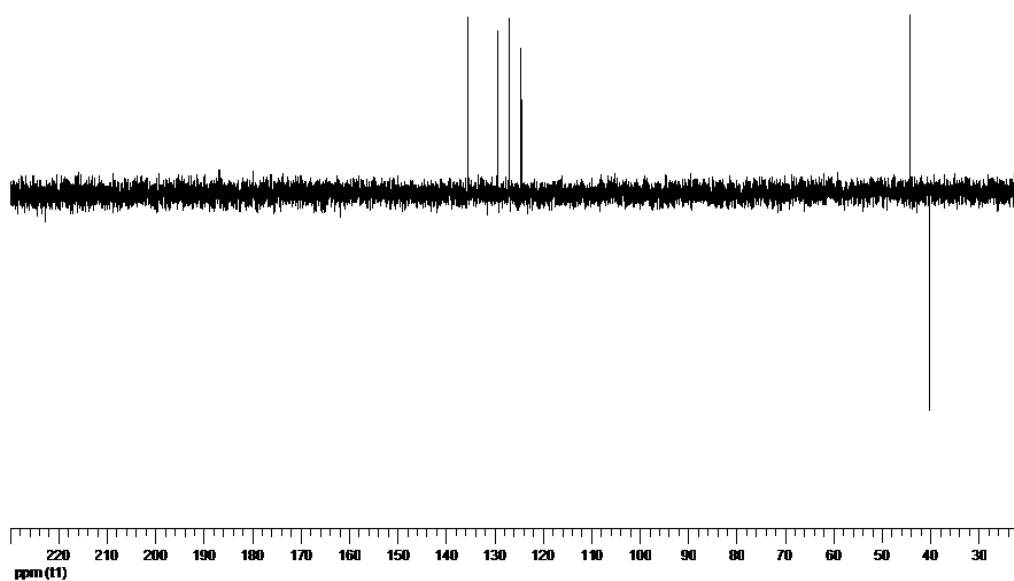
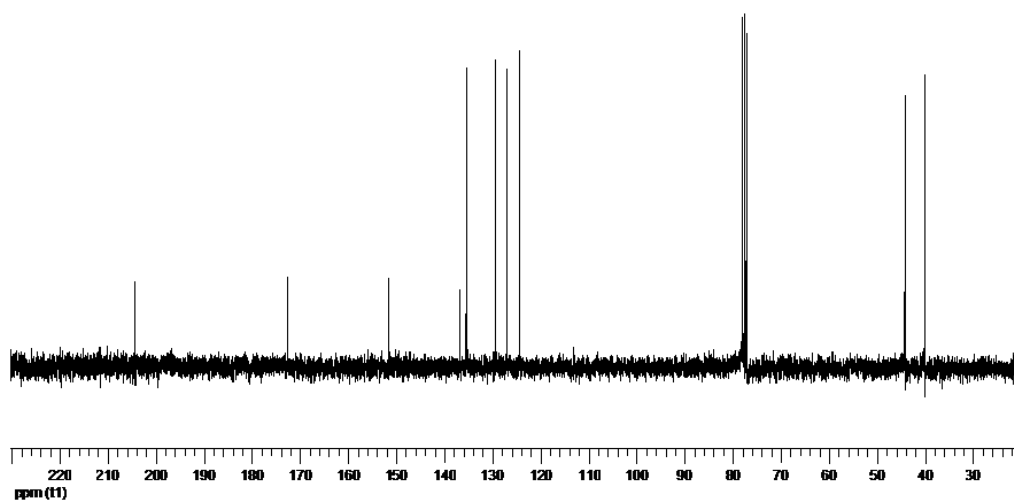
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 7.77-7.70 (m, 2H, 4-H, 7-H), 7.67-7.61 (m, 1H, 6-H), 7.45 (t, 1H,  $J$  = 7.3 Hz, 5-H), 4.26-4.20 (m, 1H, 1-H), 3.77 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.14 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}}$  = 19.1 Hz,  $J_{\text{vec}}$  = 3.6 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.83 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}}$  = 19.1 Hz,  $J_{\text{vec}}$  = 8.0 Hz, 2 $\beta$ -H).

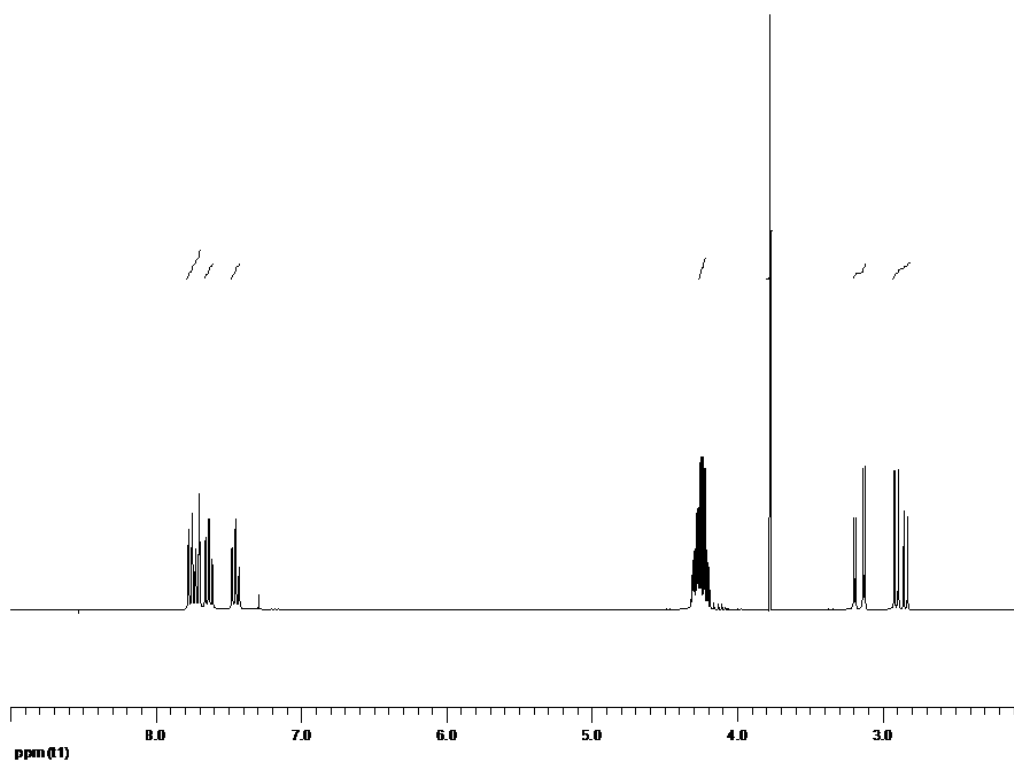
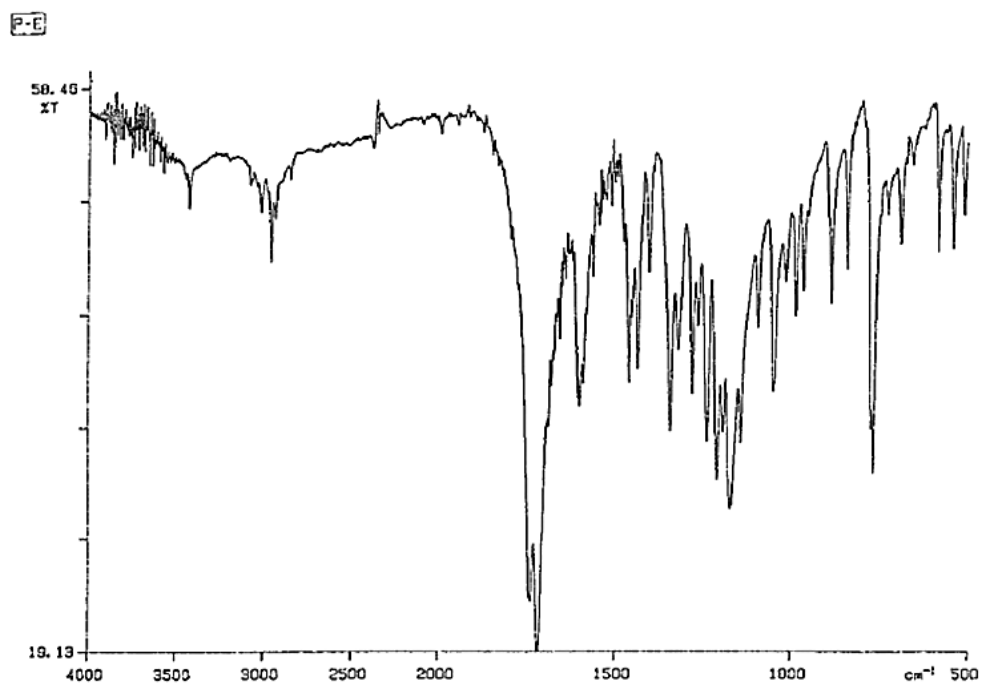
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 204.49 (C), 172.63 (C), 151.43 (C), 136.73 (C), 135.36, 129.19, 126.89 y 124.35 (CH), 53.08 ( $\text{CH}_3$ ), 44.00 (CH), 39.90 ( $\text{CH}_2$ ).

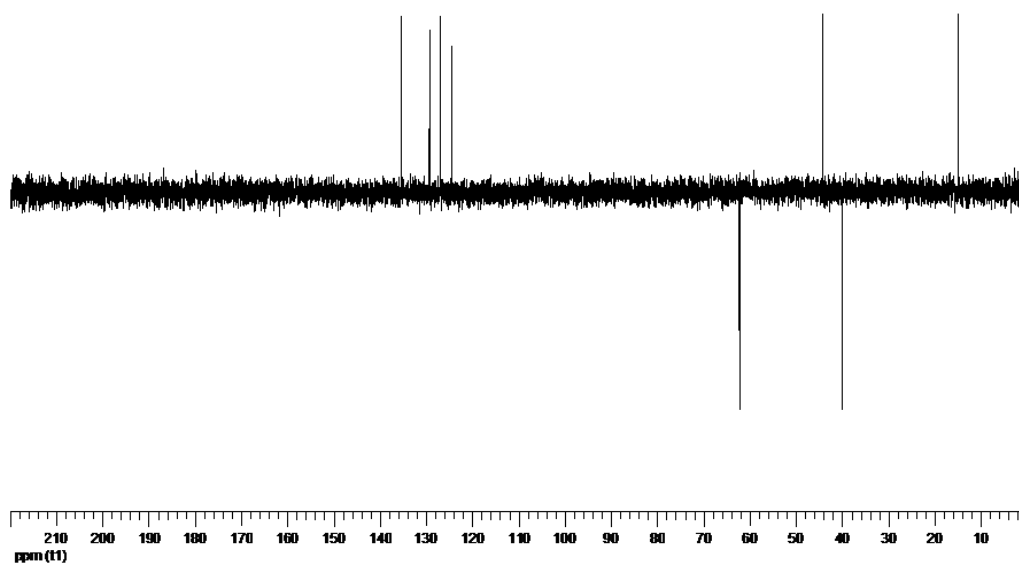
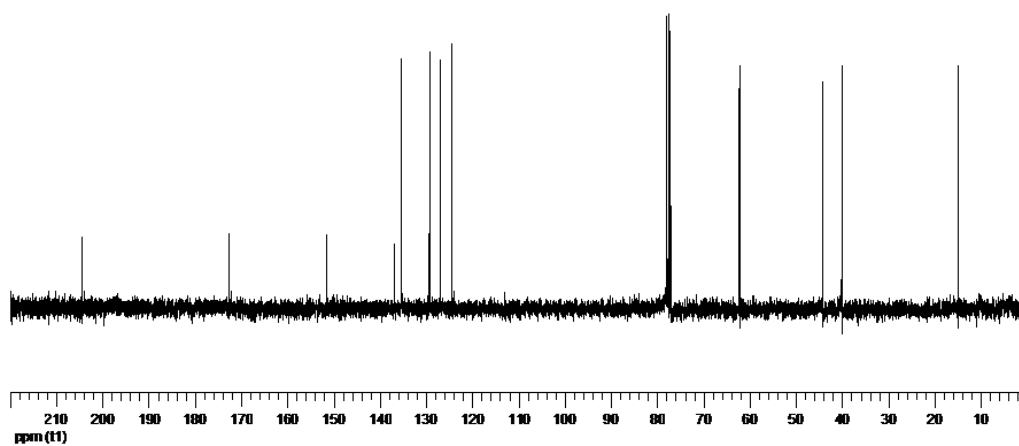
Análisis calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_3$  (190.20): C 69.46, H 5.30; encontrado C 69.31, H 5.63.



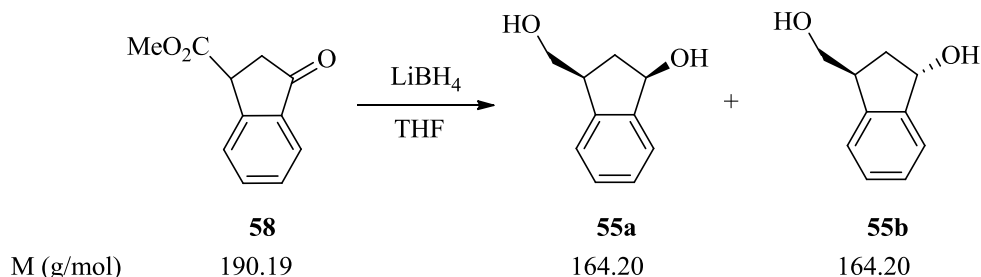








**4.3. (±)-*cis*- y (±)-*trans*-3-Hidroximetil-1-indanol (**55a** y **55b**).**



Sobre una suspensión de  $\text{LiBH}_4$  (5.52 g; 241.86 mmol) en THF anhidro (60 mL), se añadió, gota a gota, en atmósfera de argón y a  $0^\circ\text{C}$ , una solución del cetoéster **58** (8.80 g; 48.37 mmol) en THF anhidro (100 mL). Se dejó en agitación durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se adicionó, gota a gota y a  $0^\circ\text{C}$ , una solución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (40 mL). Posteriormente la mezcla se filtró sobre celita y se separaron las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa se lavó con  $\text{AcOEt}$  (3 x 100 mL) y la fase orgánica, previamente lavada con una solución saturada de  $\text{NaCl}$  y secada con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se concentró por evaporación a vacío, obteniéndose un aceite transparente que se sometió a purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (260 g), utilizando como eluyente  $\text{DCM/MeOH}$  (40:1), separándose los dos isómeros del diol, **55a** (5.50 g; Rdto. 70%) y **55b** (1.40 g; Rdto. 18%), en forma de aceites transparentes que cristalizan espontáneamente como sólidos blancos.

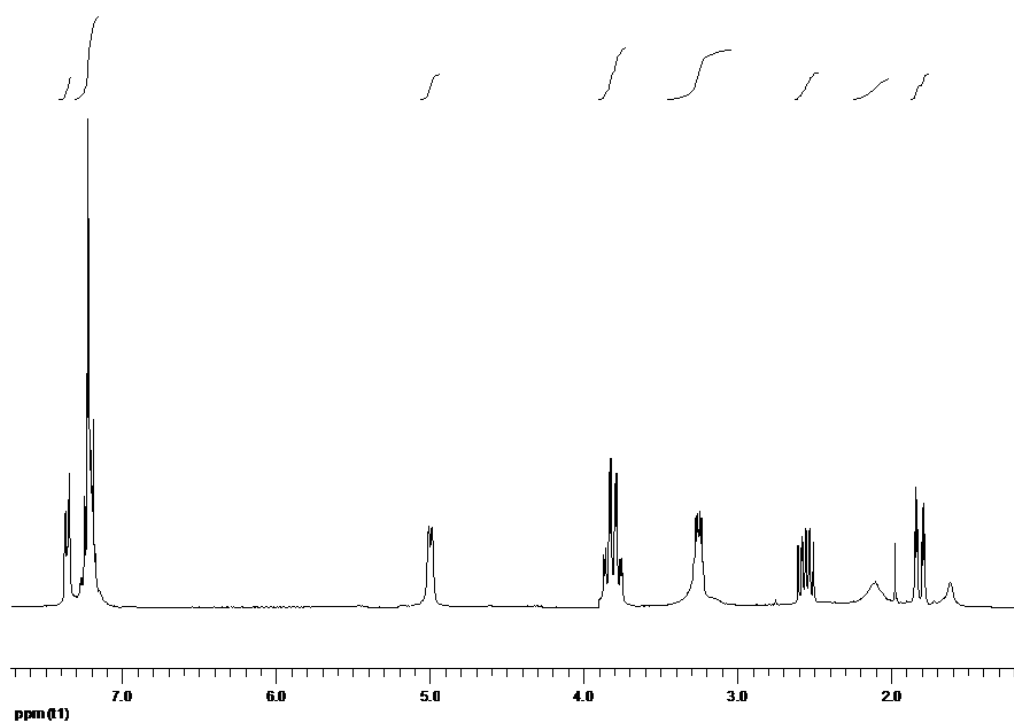
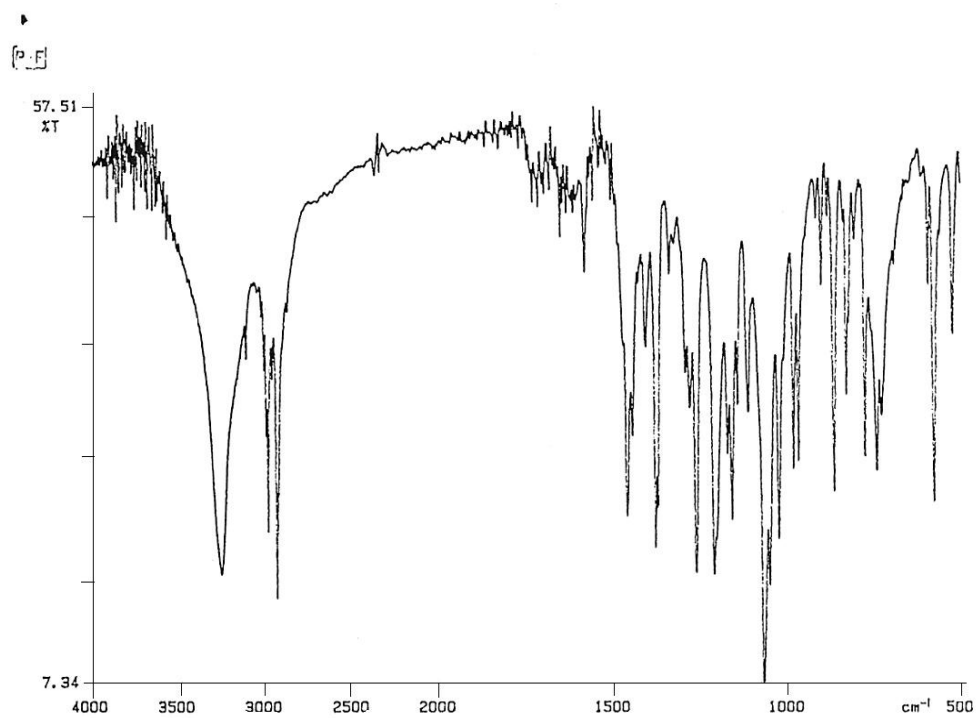
**Compuesto 55a:** Sólido blanco, p.f.  $63\text{--}65^\circ\text{C}$ .

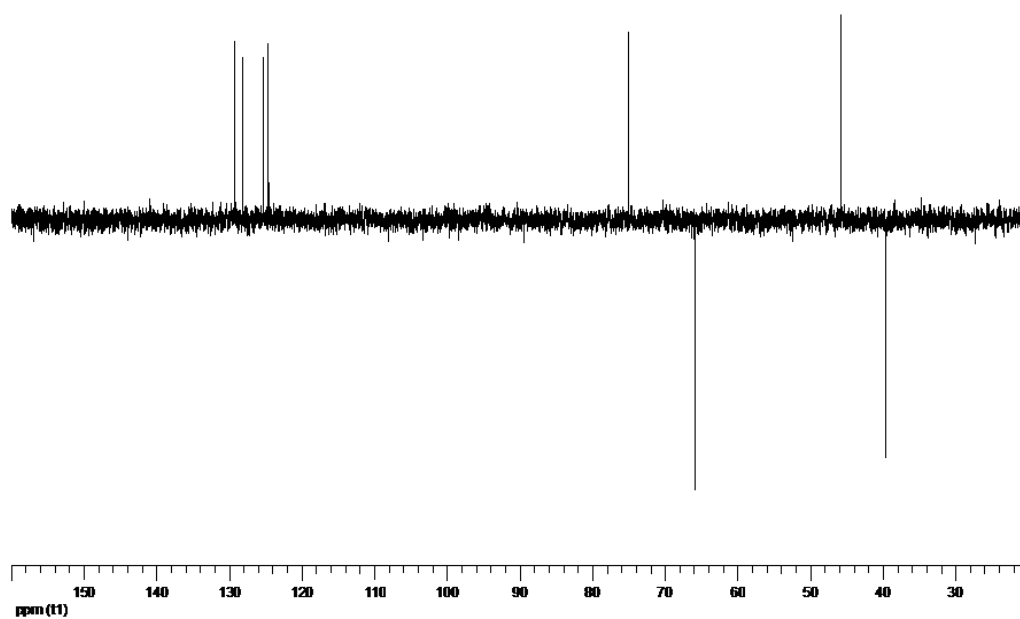
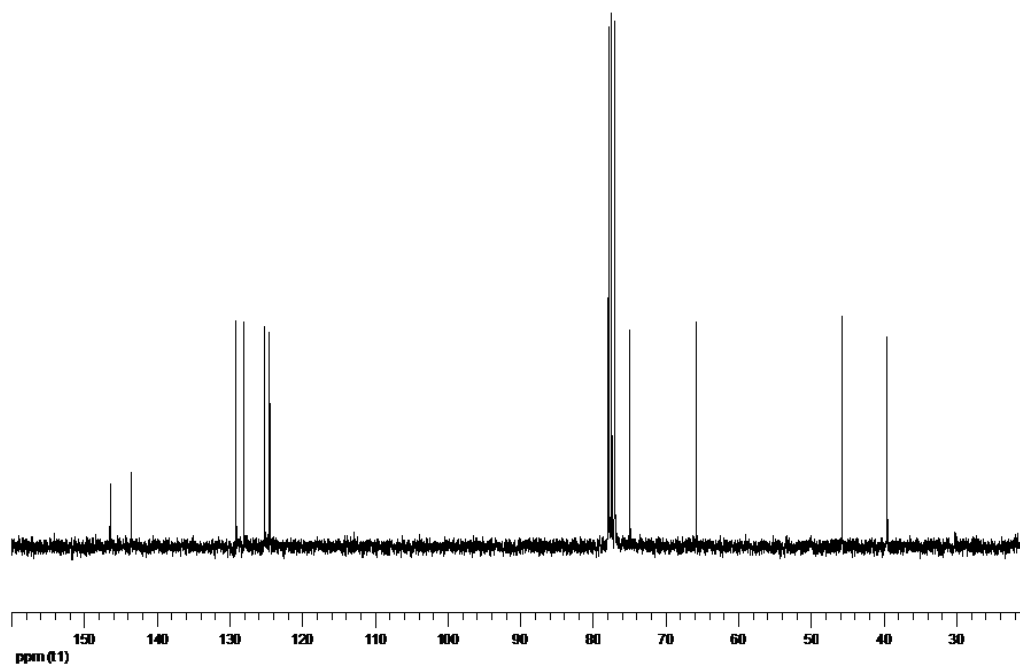
**IR (KBr)**  $\nu = 3250, 2984, 2933, 1461, 1407, 1379, 1281, 1173, 1051\text{ cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 7.35\text{--}7.18$  (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ),  $5.01\text{--}4.91$  (m, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ),  $3.83\text{--}3.72$  (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ),  $3.50\text{--}3.40$  (s.a., 1H, OH, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $3.50\text{--}3.20$  (m, 1H,  $3\beta\text{-H}$ ),  $2.57\text{--}2.49$  (m, 1H,  $2\alpha\text{-H}$ ),  $2.40\text{--}2.20$  (m, 1H, OH, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $1.81\text{--}1.74$  (m, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 146.43$  (C),  $143.77, 129.17, 128.02, 125.24$ , y  $124.56$  (CH),  $74.83$  (CH),  $65.60$  ( $\text{CH}_2$ ),  $45.63$  (CH),  $39.37$  ( $\text{CH}_2$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$  (164.20): C 73.15, H 7.37; encontrado C 73.31, H 7.12.





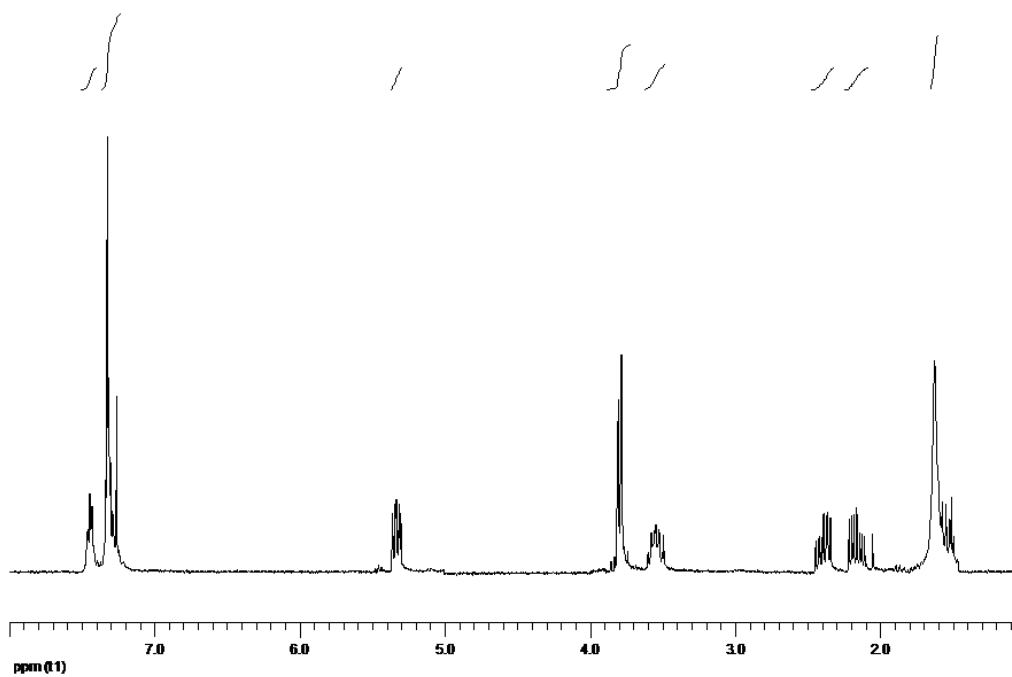
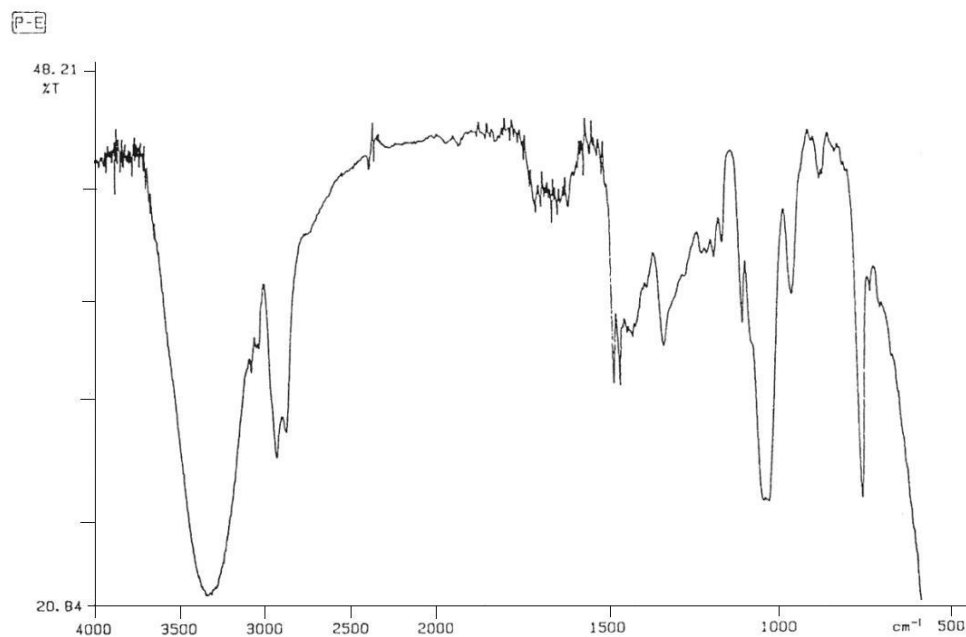
**Compuesto 55b:** Sólido blanco, p.f. 63.65°C.

**IR (KBr)**  $\nu$  = 3346, 2995, 2928, 1477, 1331, 1130, 1028  $\text{cm}^{-1}$ .

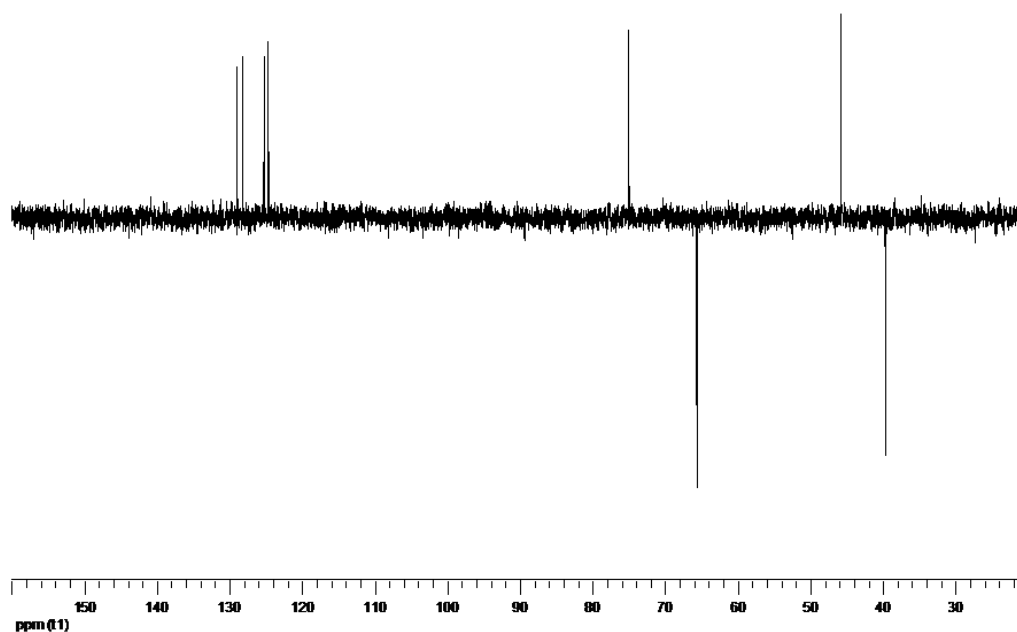
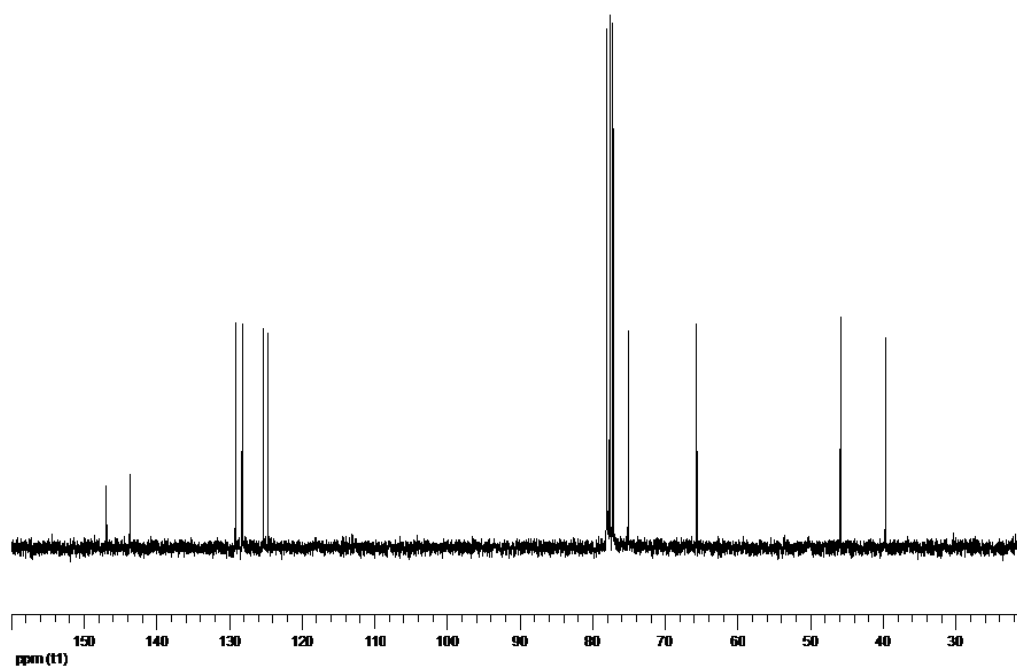
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 7.45-7.26 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.36-5.30 (m, 1H, 1 $\beta$ -H), 3.85-3.74 (d, 2H,  $J_d$  = 5.9 Hz,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.59-3.49 (m, 1H, 3 $\beta$ -H), 2.44-2.34 (m, 1H, 2 $\alpha$ -H), 2.21-2.05 (m, 1H, 2 $\beta$ -H), 1.62 (s.an., 2H, 2 x OH, intercambian con  $\text{D}_2\text{O}$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 146.85 (C), 143.67 (C), 129.01, 128.16, 125.23 y 124.62 (CH), 74.97 (CH), 65.32 ( $\text{CH}_2$ ), 45.72 (CH), 39.52 ( $\text{CH}_2$ ).

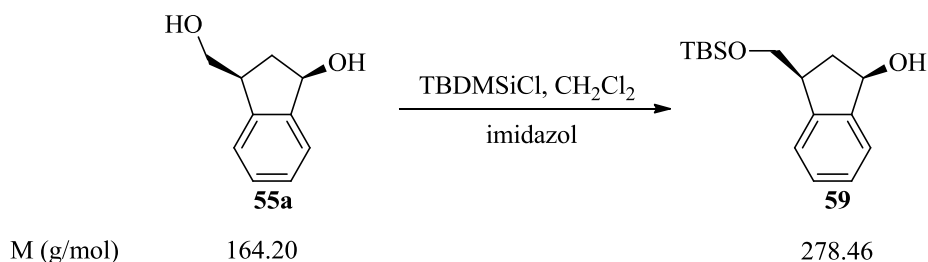
Análisis calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$  (164.20): C 73.15, H 7.37; encontrado C 73.01, H 7.43.







#### 4.4. (±)-*cis*-3-(*tert*-Butildimetilsililo)metilindanol (**59**).



Sobre una suspensión del diol **55a** (1.60 g; 8.37 mmol) e imidazol (1.13 g; 16.74 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (60 mL) se añadió, a  $0^\circ\text{C}$  y bajo atmósfera de argón, una solución del cloruro de *tert*-butildimetilsililo (1.35 g; 9.21 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (20 mL). La mezcla se enfrió entre  $0$ - $5^\circ\text{C}$  y se agitó durante 24 horas. A continuación se llevó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. Se añadió  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (60 mL) y se extrajo con  $\text{NaHCO}_3$  (80 mL). La fase acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) y la fase orgánica se lavó con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 mL) y se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Por evaporación a vacío se obtuvo un aceite amarillo, que fue purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice (84 g), usando como fase móvil Hexano/ $\text{AcOEt}$  (12:1), obteniéndose el compuesto **59**, como un aceite incoloro (1.25 g; Rdto. 54%).

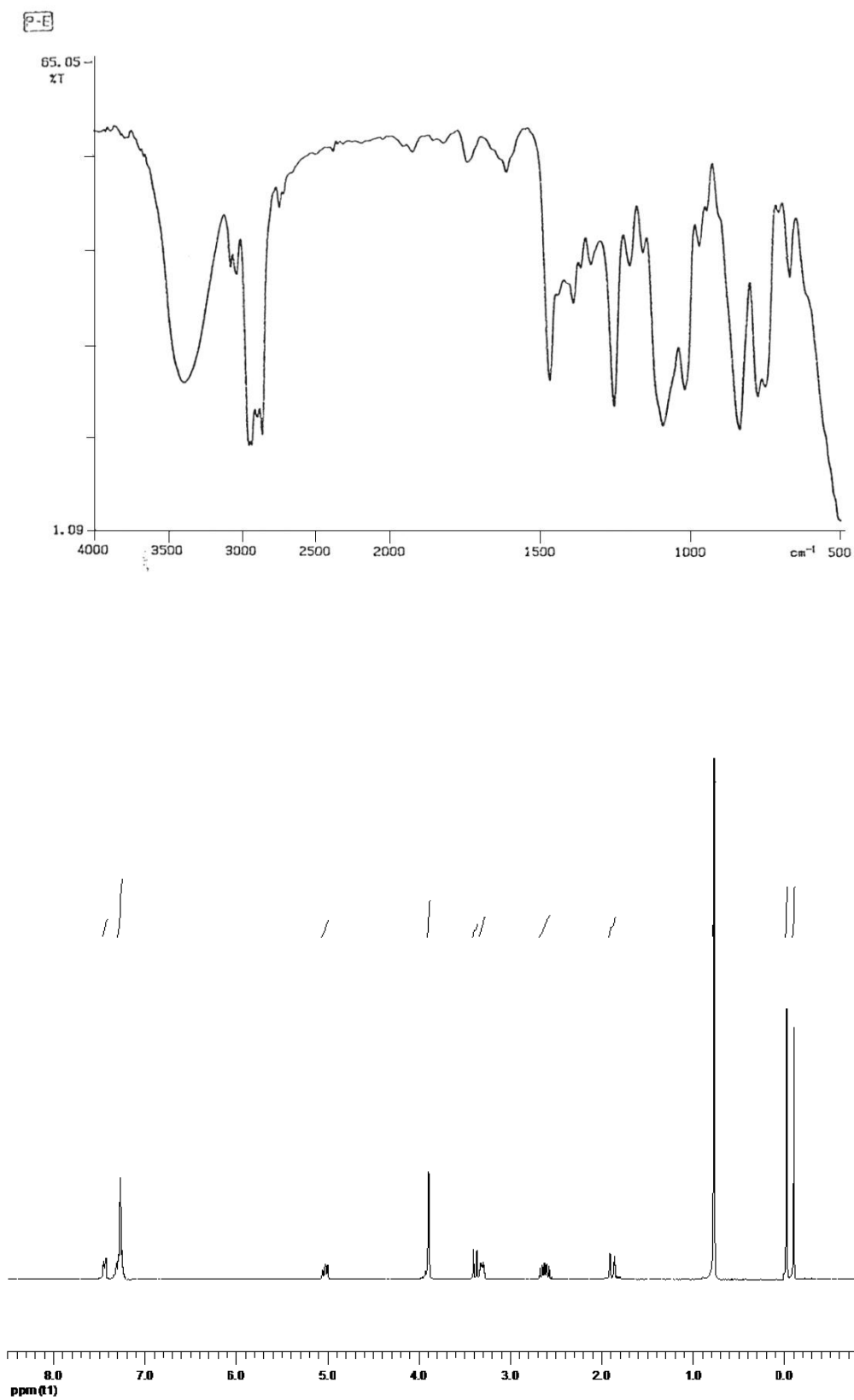
**Compuesto 59:** Aceite incoloro.

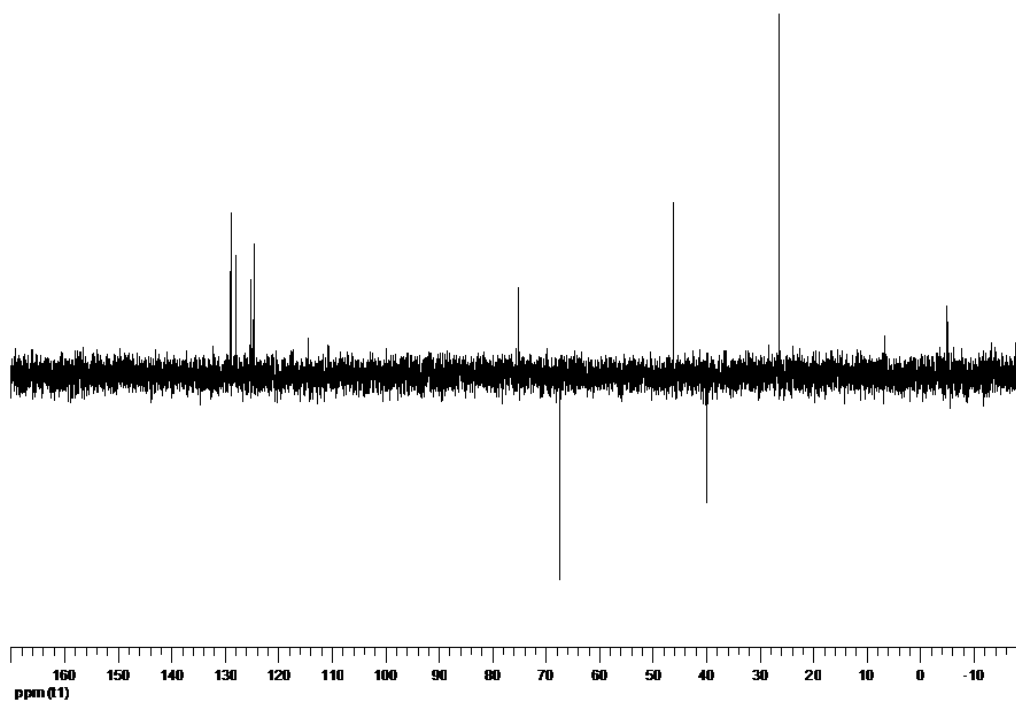
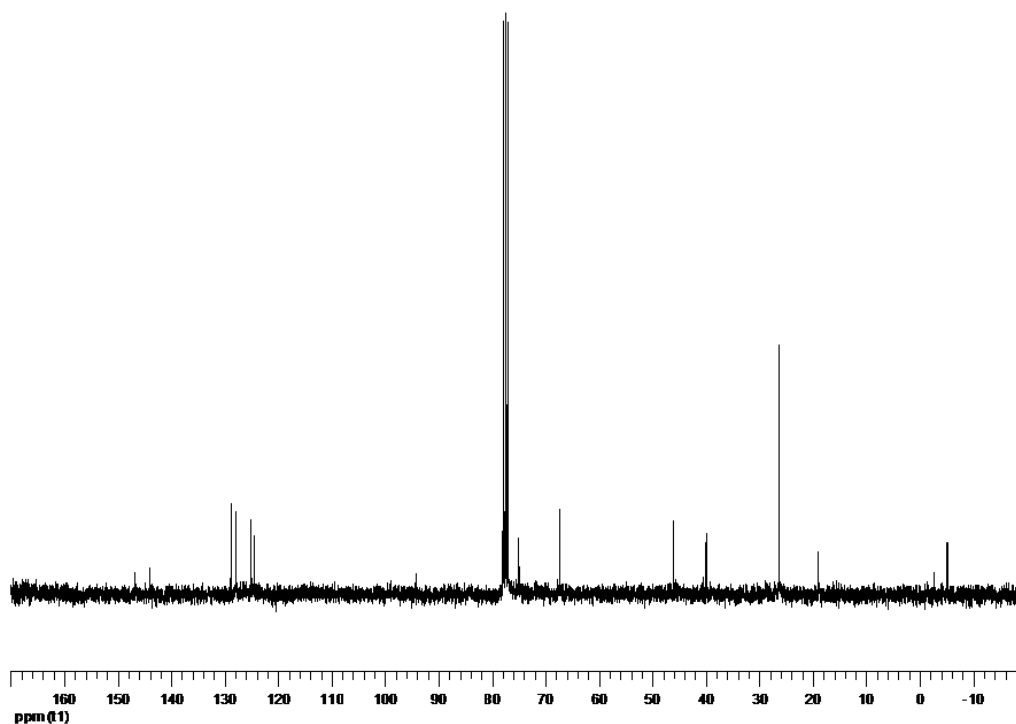
**IR (NaCl)**  $\nu = 3383, 3030, 2738, 1918, 1736, 1607, 1467, 1387, 1329, 1254, 1200, 1156, 1020, 968, 776, 667 \text{ cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 7.45\text{-}7.24$  (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ),  $5.05\text{-}4.99$  (m, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ),  $3.89\text{-}3.88$  (d, 2H,  $J_{\text{(d)}} = 3.4 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2\text{OSi-}$ ),  $3.39\text{-}3.36$  (d, 1H,  $J_{\text{(d)}} = 3.5 \text{ Hz}$ , intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , OH),  $1.90\text{-}1.84$  (m, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ),  $2.66\text{-}2.57$  (m, 1H,  $2\alpha\text{-H}$ ),  $3.33\text{-}3.28$  (m, 1H,  $3\beta\text{-H}$ ),  $0.76$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ),  $-0.04$  (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $-0.12$  (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

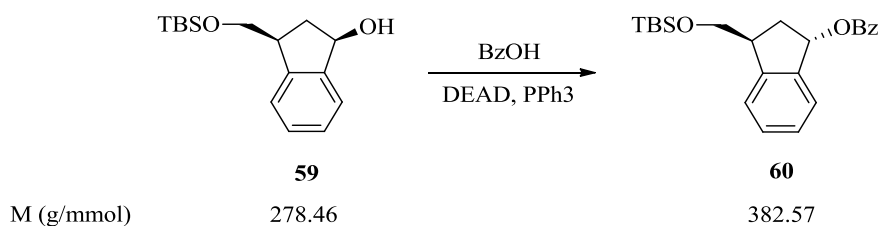
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 146.69$  (C),  $144.05$  (C),  $128.82, 127.83, 125.14$  y  $124.51$  (CH),  $74.98$  (CH),  $67.19$  ( $\text{CH}_2$ ),  $45.97$  (CH),  $39.81$  ( $\text{CH}_2$ ),  $26.16$  [ $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ],  $18.78$  (C),  $-5.24$  ( $\text{CH}_3$ ),  $-5.38$  ( $\text{CH}_3$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{Si}$  (278.46): C 69.01, H 9.41; encontrado C 69.32, H 9.36.





#### 4.5. Benzoato de (±)-*trans*-3-[(*tert*-butildimetilsililo)metil]-1-indanilo (**60**).



Sobre una disolución de **59** (1.00 g; 3.59 mmol), ácido benzoico (0.62 g; 5.02 mmol) y trifenilfosfina (1.10 g; 3.95 mmol) en THF (40 mL) se adicionó, gota a gota, bajo atmósfera de argón y a 0°C, una solución de DEAD (1.56 mL) en THF (5 mL). La mezcla resultante se agitó a 0°C una hora y a temperatura ambiente 25 horas. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 80 mL de diclorometano y una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (60 mL). Seguidamente la fase acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 60 mL). Las fases orgánicas resultantes se rotaron a vacío para eliminar el exceso de disolvente, proporcionando un sólido blanquecino que fue purificado mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (130 g) empleando como eluyente Hexano/ AcOEt (60:1), obteniéndose **60** como un líquido transparente (1.03 g; Rdto. 75%).

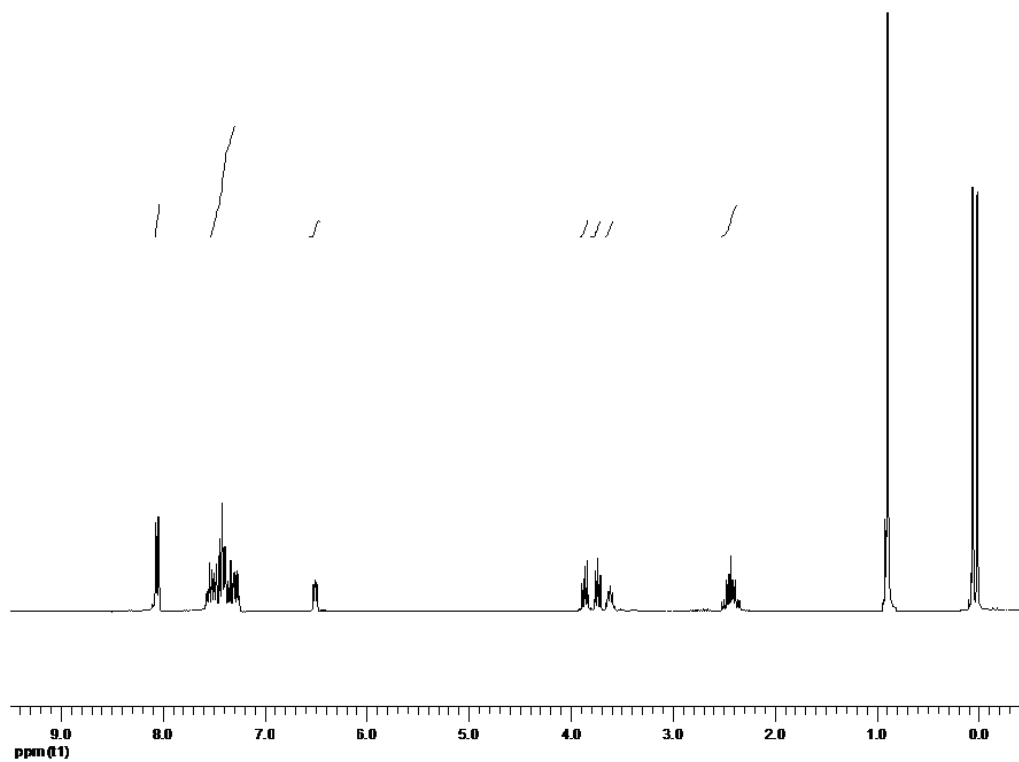
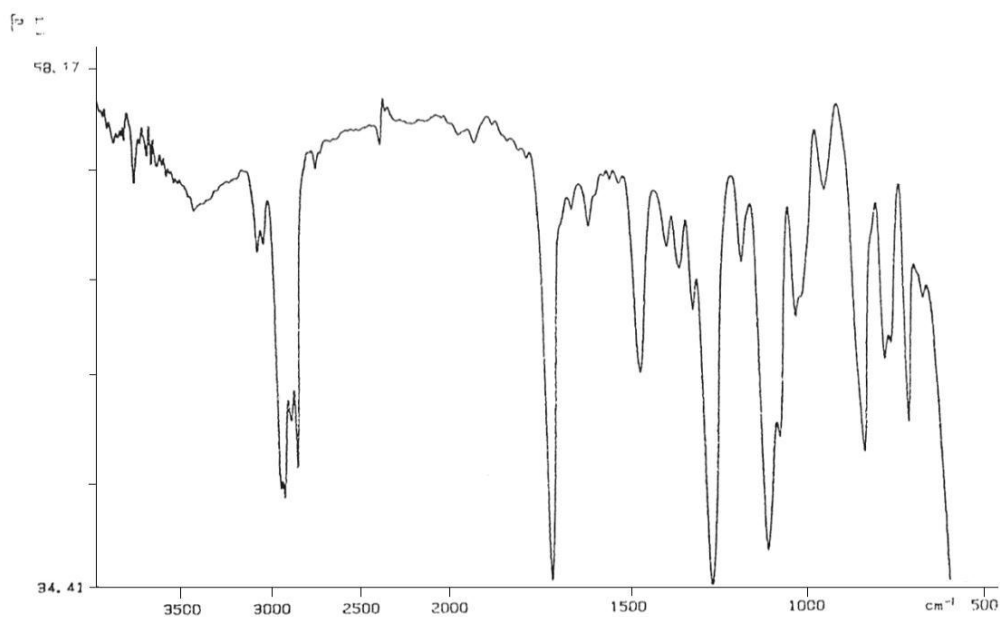
**Compuesto 60:** Aceite transparente.

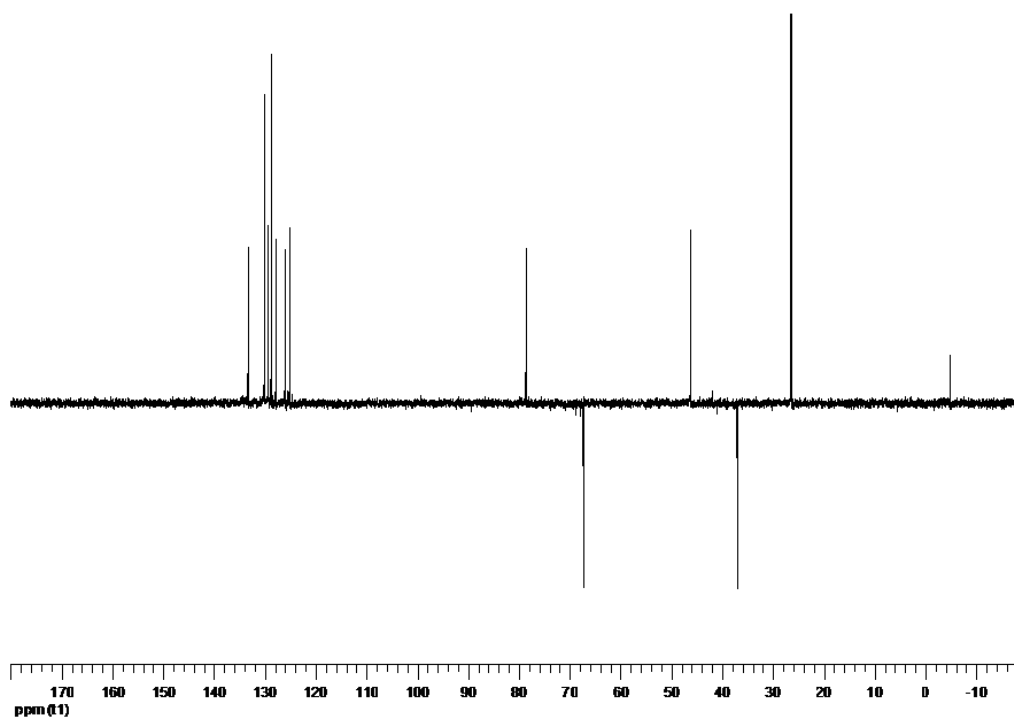
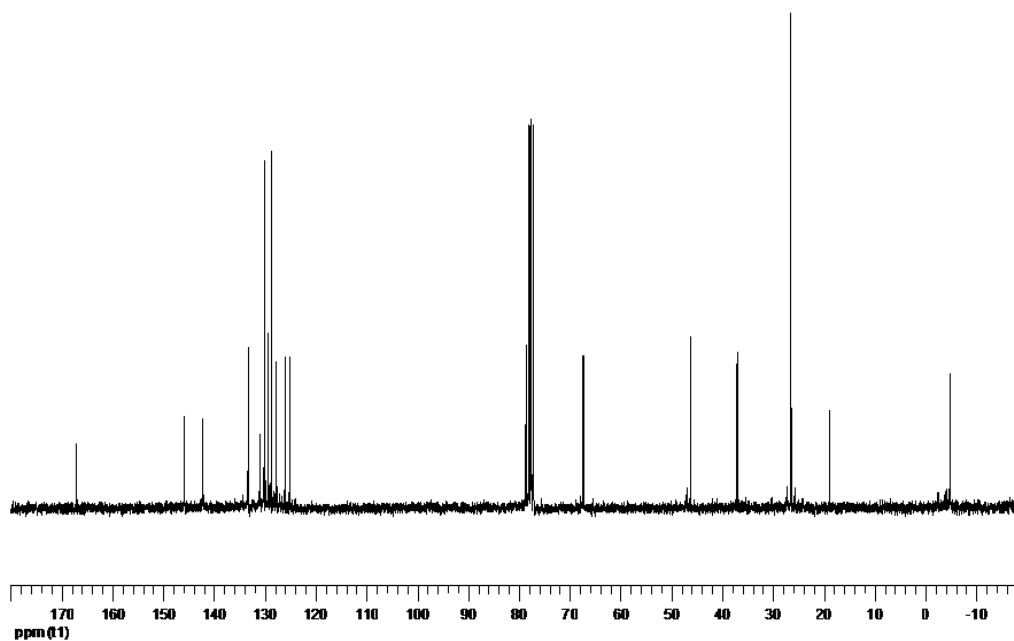
**IR (NaCl)**  $\nu$  = 3068, 2857, 1603, 1462, 1351, 1175, 1109, 1024 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 8.06-8.04 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.57-7.26 (m, 7H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 4 x H<sub>arom</sub>), 6.52-6.48 (m, 1H, 1 $\beta$ -H), 3.88-3.83 (m, 1H, CHHOSi-), 3.76-3.70 (m, 1H, CHHOSi-), 3.65-3.57 (m, 1H, 3 $\beta$ -H), 2.51-2.33 (m, 2H, 2 $\alpha$ -H, 2 $\beta$ -H), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si-), 0.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si-).

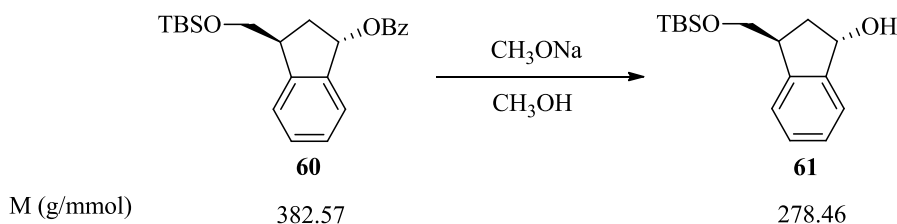
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 167.02 (C), 145.80 (C), 142.15 (C), 133.27, 130.91, 130.09, 129.28, 128.68, 127.77, 126.02, 125.10 (CH), 78.53 (CH), 67.23 (CH<sub>2</sub>), 46.11 (CH), 36.90 (CH<sub>2</sub>), 26.29 (CH<sub>3</sub>), 18.68 (C), -4.98 (CH<sub>3</sub>), -5.10 (CH<sub>3</sub>).

Análisis calculado para C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>Si (382.57): C 72.21, H 7.90; encontrado C 72.03, H 8.25.





**4.6. (±)-trans-3-[(*tert*-Butildimetilsililoxi)metil]-1-indanol (**61**).**



Una solución de **60** (0.50 g; 1.31 mmol) y MeONa (0.50 g; 1.43 mmol) en metanol (20 mL) se agitó durante 16 horas, bajo atmósfera de argón, a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el exceso de disolvente se eliminó por evaporación a vacío, aislándose un sólido blanco, el cual se sometió a cromatografía sobre gel de sílice (45 g), eluyendo con Hexano/AcOEt (18:1), obteniéndose el compuesto **61** como un aceite transparente (0.28 g; Rdto. 95%).

**Compuesto 61:** Aceite transparente.

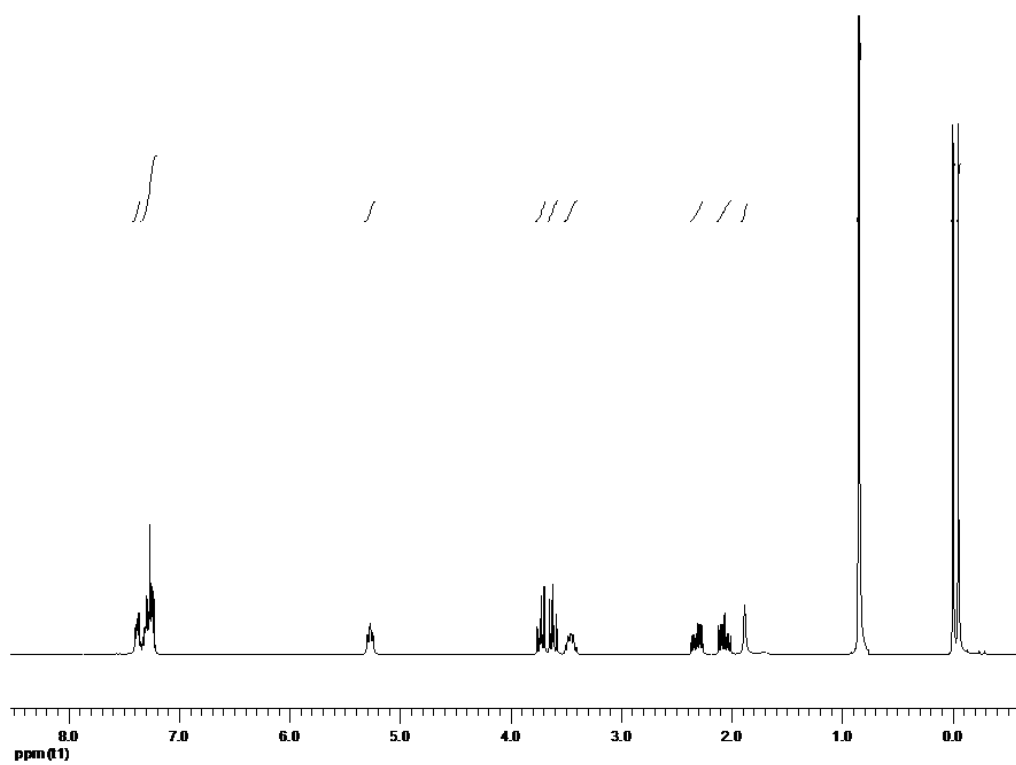
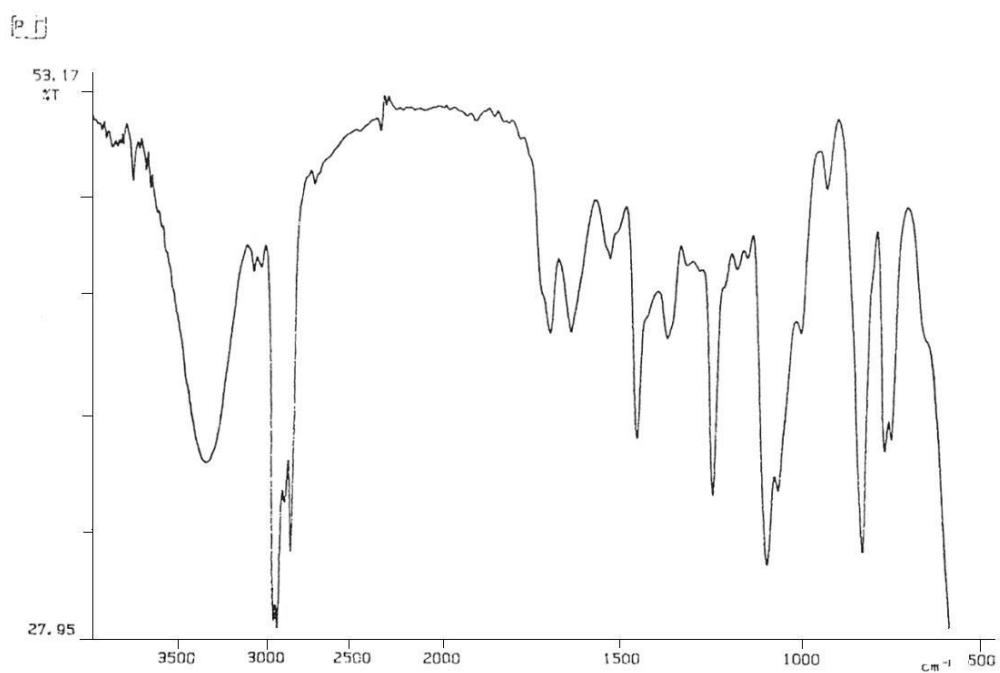
**IR (NaCl)**  $\nu = 3345, 3030, 2930, 2857, 1720, 1466, 1385, 1254, 1103 \text{ cm}^{-1}$ .

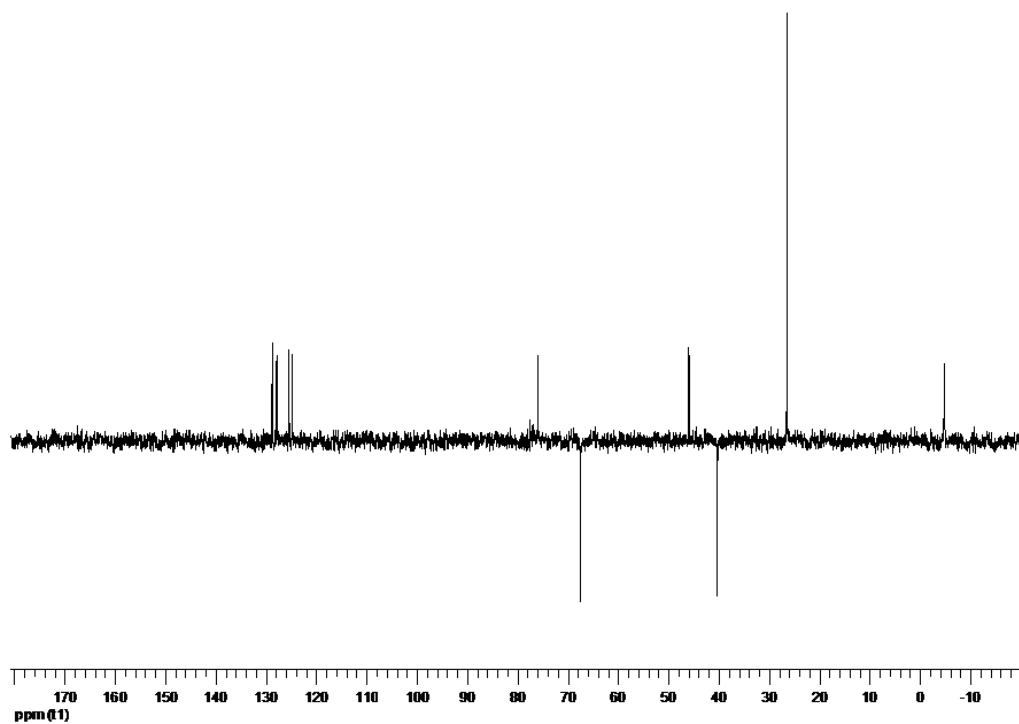
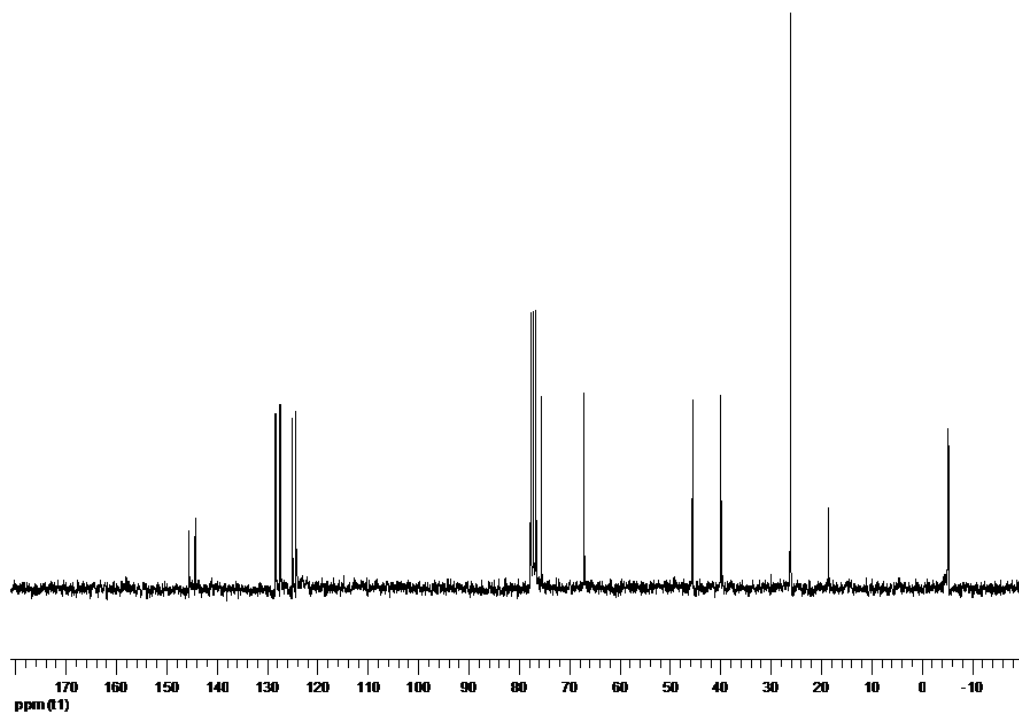
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 7.39\text{-}7.36$  (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ),  $7.23\text{-}7.13$  (m, 3H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ),  $5.29\text{-}5.26$  (m, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ),  $3.74\text{-}3.70$  (m, 1H,  $\text{CHHOSi-}$ ),  $3.63\text{-}3.60$  (m, 1H,  $\text{CHHOSi-}$ ),  $3.48\text{-}3.42$  (m, 1H,  $3\beta\text{-H}$ ),  $2.34\text{-}2.28$  (m, 1H,  $2\alpha\text{-H}$ ),  $2.10\text{-}2.02$  (m, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ), 1.87 (s.an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , OH), 0.83 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), -0.06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), -0.09 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 145.49$  (C), 144.27 (C), 128.28, 127.36, 124.91 y 124.21 (CH), 75.45 (CH), 66.91 ( $\text{CH}_2$ ), 45.39 (CH), 39.74 ( $\text{CH}_2$ ), 25.84 ( $\text{CH}_3$ ), 18.24 (C), -5.38 ( $\text{CH}_3$ ), -5.50 ( $\text{CH}_3$ ).

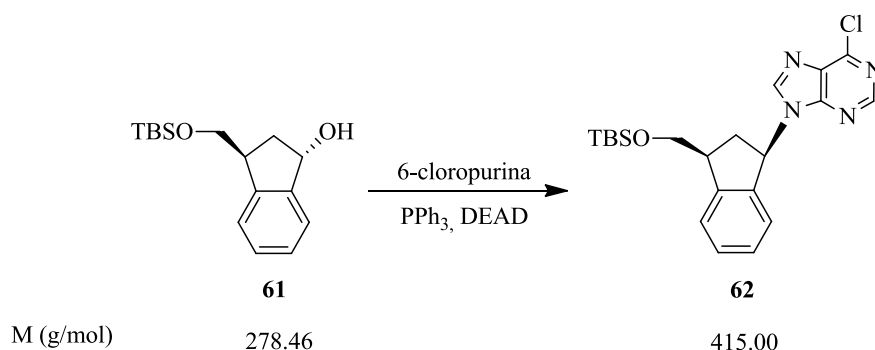
Análisis calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{Si}$  (278.46): C 69.01, H 9.41; encontrado C 69.37, H 9.26.







**4.7. (±)-cis-3-(6-Cloro-9H-purin-9-il)-1-[(*tert*-butildimetilsililoxi)metil]indano (**62**).**



Sobre una disolución de **61** (0.28 g; 1.01 mmol), trifenilfosfina (0.30 g; 1.11 mmol) y 6-cloropurina (0.22 g; 1.41 mmol) en THF (20 mL), bajo atmósfera de argón y a 0°C, se añadió, gota a gota, una solución de DEAD (0.44 mL; 1.11 mmol) en THF (10 mL). La mezcla resultante se agitó 1 hora a 0°C y 39 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío y el residuo obtenido fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (50 g), eluyendo con Hexano/AcOEt (18:1), obteniéndose **62** bajo la forma de un aceite amarillo (0.10 g; Rdto. 24%).

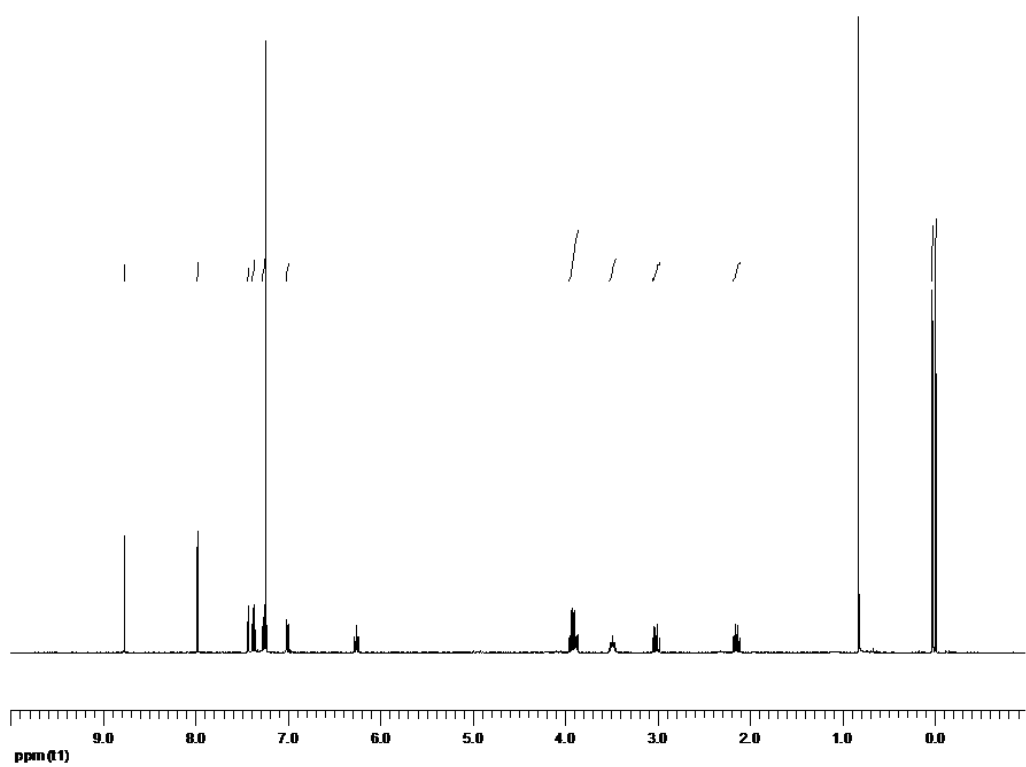
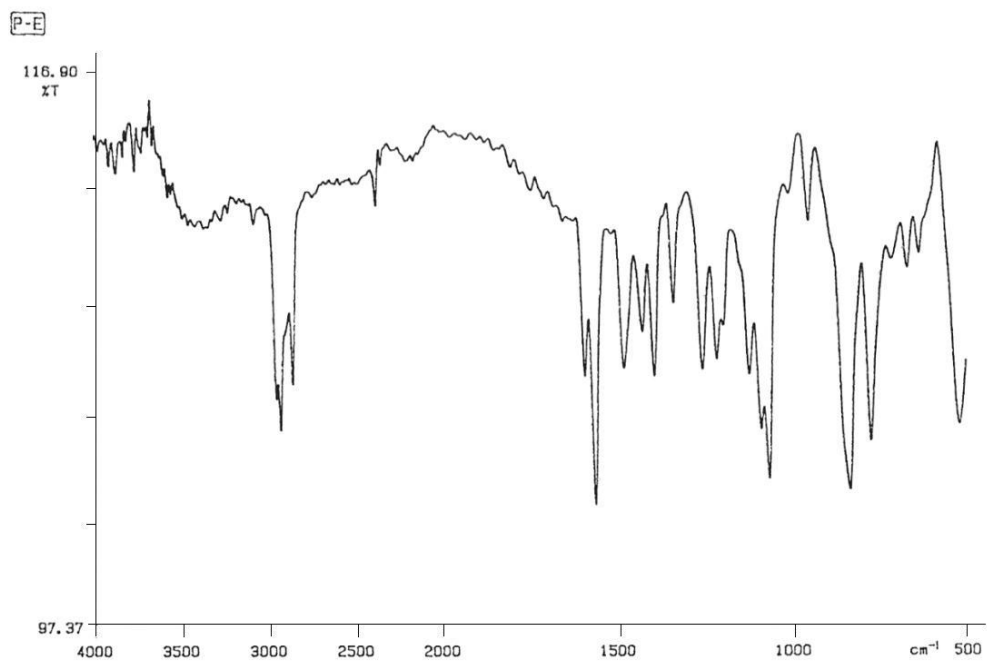
**Compuesto 62:** Aceite amarillo.

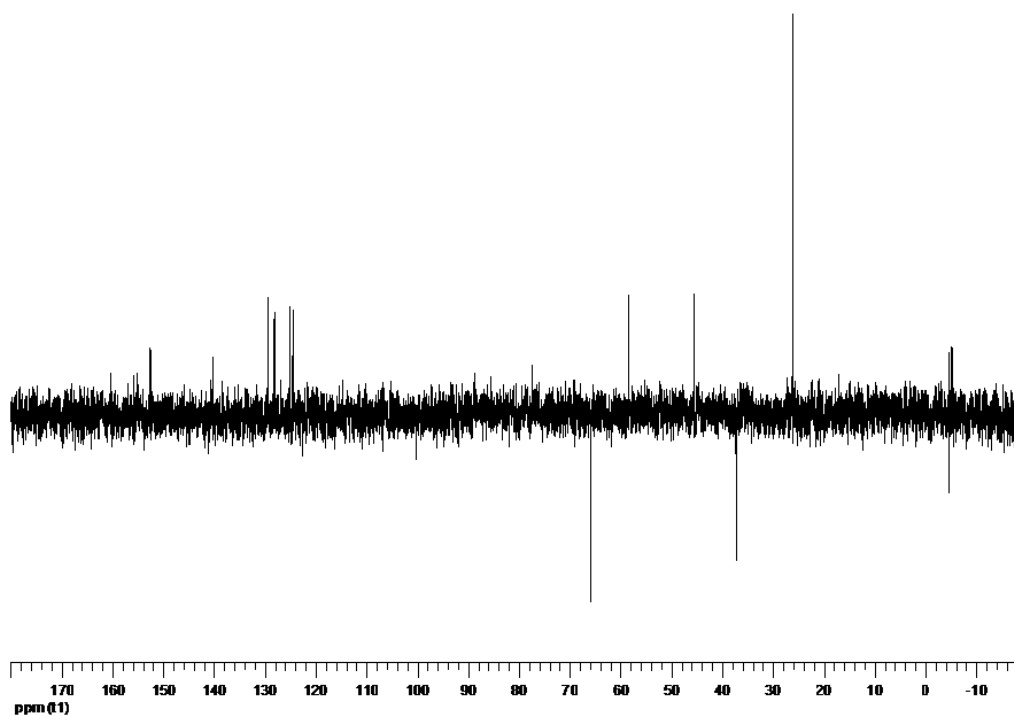
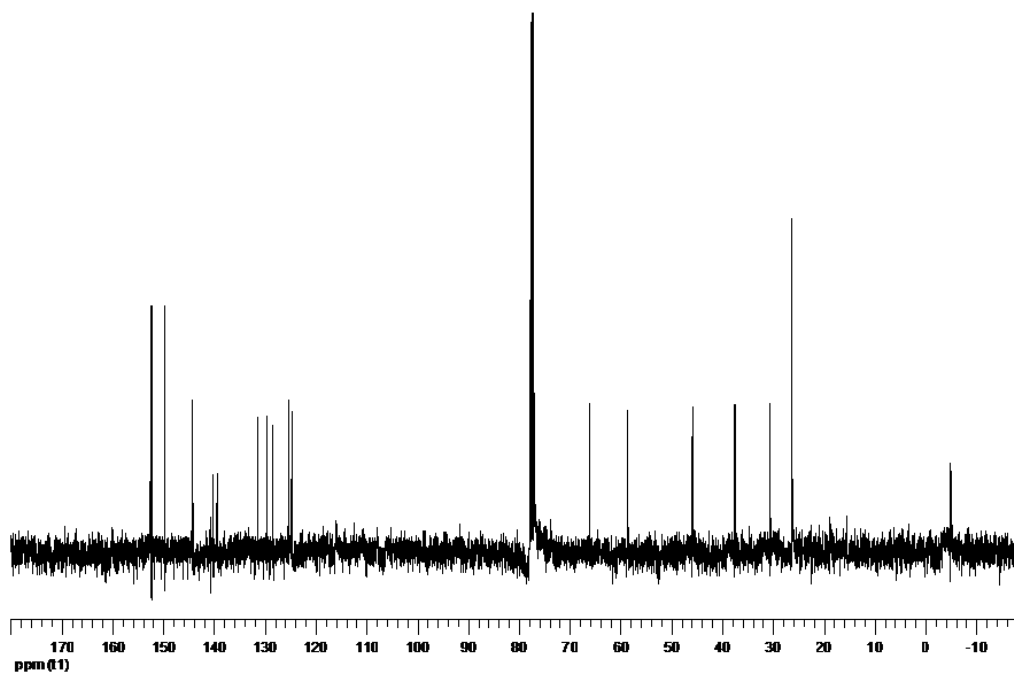
**IR (NaCl)**  $\nu$  = 2928, 1562, 1391, 1254, 1066  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 8.80 (s, 1H, 2'-H), 8.00 (s, 1H, 8'-H), 7.47-7.02 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.28 (t, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, 3 $\beta$ -H), 3.98-3.86 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OSi}$ ), 3.55-3.46 (m, 1H, 1 $\beta$ -H), 3.04 (dt, 1H,  $J_{(t)}$  = 13.6 Hz,  $J_{(d)}$  = 8.4 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.16 (dt, 1H,  $J_{(t)}$  = 13.6 Hz,  $J_{(d)}$  = 7.4 Hz, 2 $\beta$ -H), 0.84 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

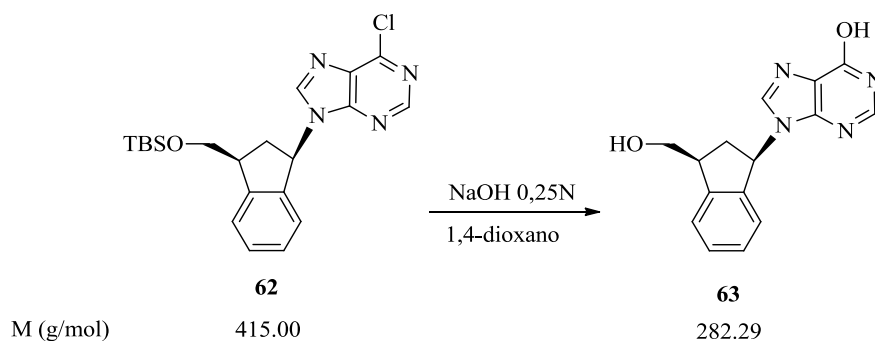
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 152.43 (CH), 152.25 (C), 149.77 (C), 144.24 (C), 140.20 (CH), 139.37 (C), 132.11 (C), 129.62, 128.35, 125.32 y 124.53 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 66.00 ( $\text{CH}_2$ ), 58.64 (CH), 45.79 (CH), 37.37 ( $\text{CH}_2$ ), 30.04 (C), 26.16 (3 x  $\text{CH}_3$ ), -4.98 ( $\text{CH}_3$ ), -5.01 ( $\text{CH}_3$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{ClN}_4\text{OSi}$  (415.00): C 60.78, H 6.56, N 13.50; encontrado C 60.15, H 6.98, N 13.63.





**4.8. (±)-*cis*-3-(6-Hidroxi-9*H*-purin-9-il)-1-indanilmetanol (**63**).**



Una solución de la mezcla **62** (0.06 g; 0.14 mmol) en 1,4-dioxano (15 mL) y NaOH 0.25 N (8 mL) se agitó 4 horas a temperatura ambiente. Se concentró el disolvente por evaporación a vacío y se realizaron sucesivas coevaporaciones con tolueno para eliminar el exceso de disolvente, aislándose un aceite blanco que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (12 g), empleando como fase móvil DCM/MeOH (30:1), obteniéndose **63** como un sólido blanco (0.03 g; Rdto. 73%).

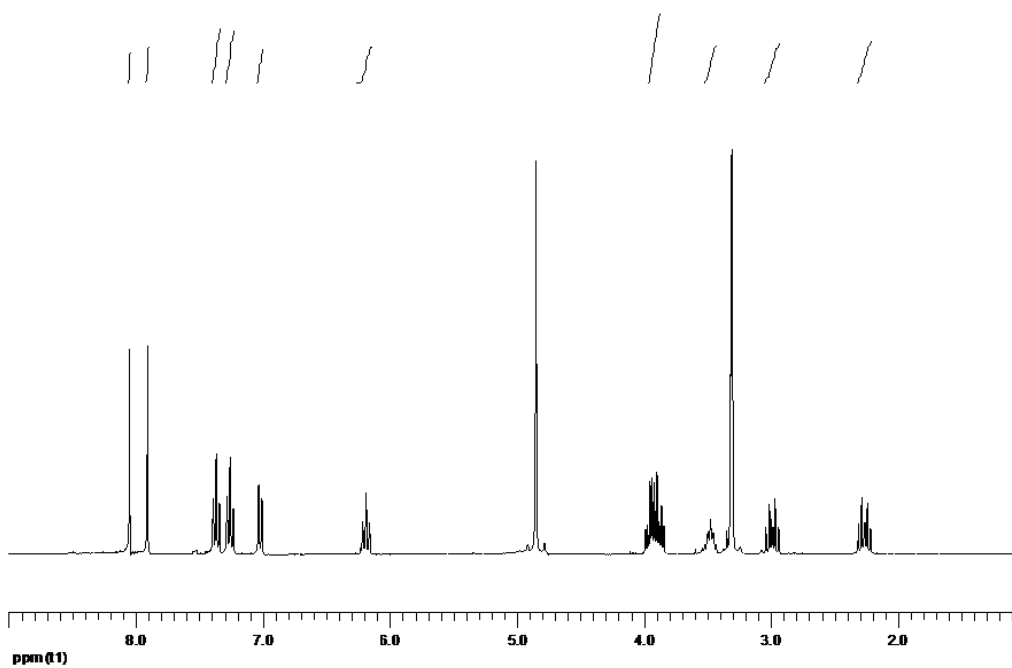
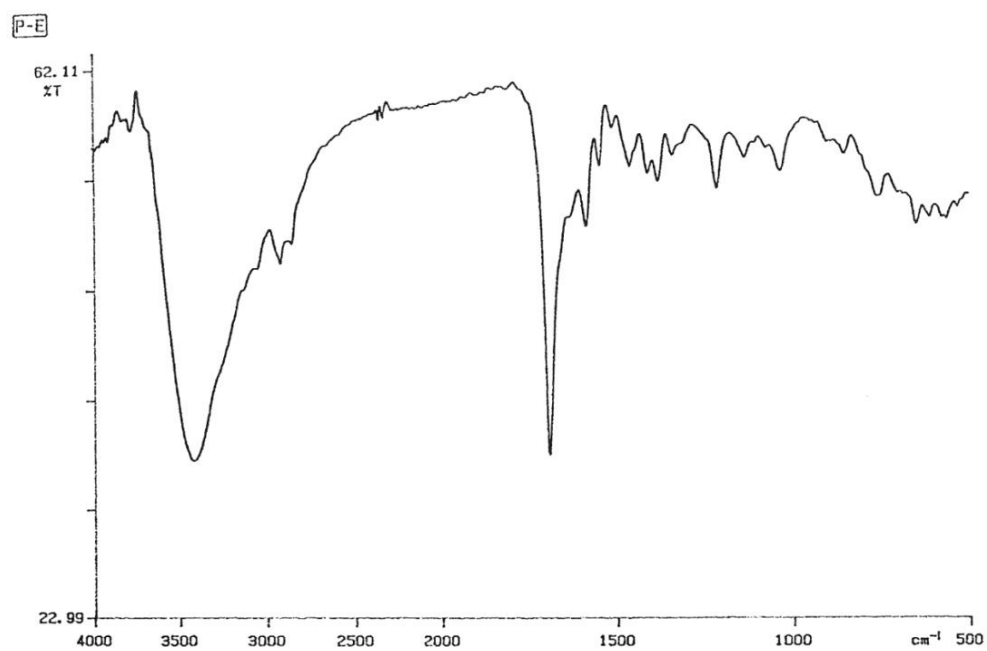
**Compuesto 63:** Sólido blanco, p.f. 168-170°C

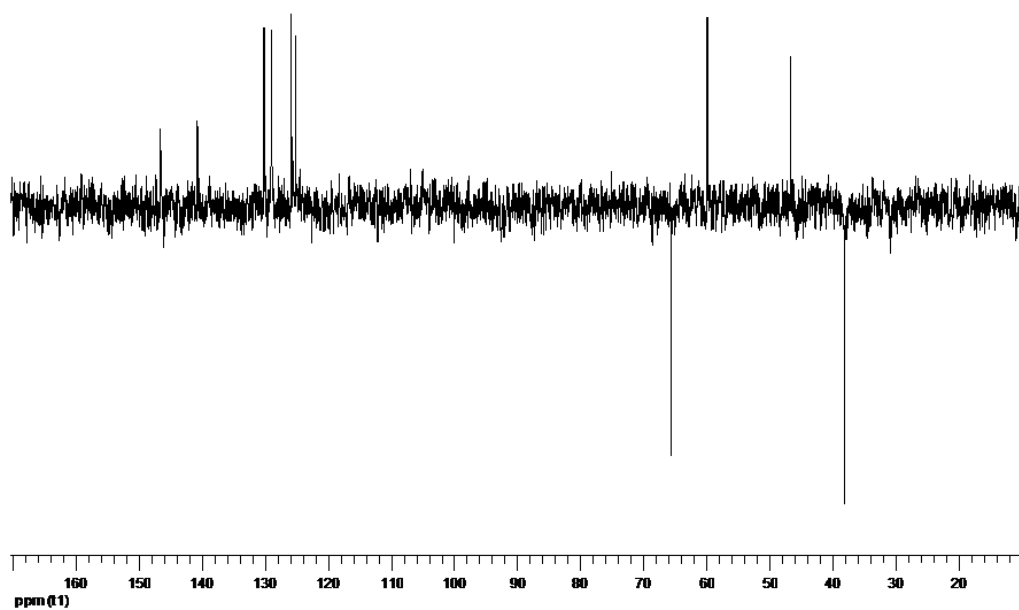
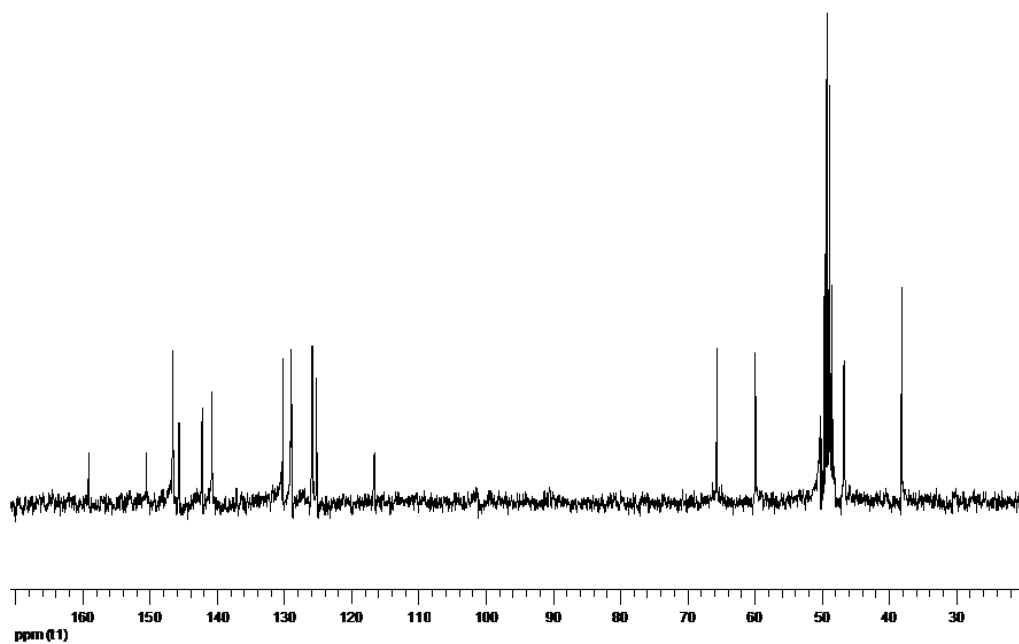
**IR (NaCl)**  $\nu$  = 3417, 2923, 1693, 1586, 1459, 1379, 1212, 1032  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, MeOH- $d_4$ )**  $\delta$  = 8.05 (s, 1H, 8'-H), 7.91 (s, 1H, 2'-H), 7.50-7.01 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.18 (t, 1H,  $J_{\text{ti}}$  = 8.0 Hz, 3 $\beta$ -H), 3.98-3.84 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.49-3.45 (m, 1H, 1 $\beta$ -H), 3.03-2.93 (dt, 1H,  $J_{\text{ti}}$  = 13.4 Hz,  $J_{\text{di}}$  = 8.3 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.31-2.21 (dt, 1H,  $J_{\text{ti}}$  = 13.4 Hz,  $J_{\text{di}}$  = 7.6 Hz, 2 $\beta$ -H).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, MeOH- $d_4$ )**  $\delta$  = 159.08 (C), 150.45 (C), 146.55 (CH), 145.62 (C), 142.18 (C), 140.70 (CH), 130.12, 128.87, 125.78 y 125.11 (CH), 116.53 (C), 65.52 ( $\text{CH}_2$ ), 59.76 (CH), 46.55 (CH), 37.99 ( $\text{CH}_2$ ).

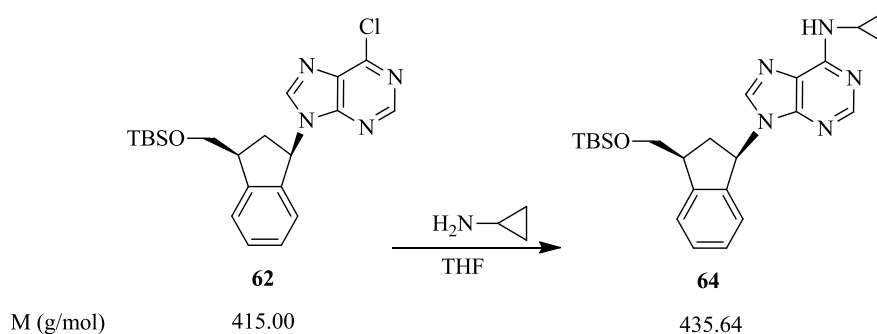
Análisis calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$  (282.29): C 63.82, H 5.00, N 19.85; encontrado C 63.67, H 4.76, N 19.98.







**4.9. (±)-*cis*-3-(6-*N*-Ciclopropilamino-9*H*-purin-9-il)-1-[(*tert*-butildimetilsililo)metil]-indano (**64**).**



En un reactor a presión, purgado previamente con argón, se dispuso una solución de **62** (0.10 g; 0.24 mmol) y *N*-ciclopropilamina (0.03 mL; 0.26 mmol) en THF (15 mL) y se agitó 150 horas a 50°C. A continuación se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío, aislándose un aceite amarillo que fue sometido a cromatografía en columna de gel de sílice (8 g), utilizando como eluyente CHCl<sub>3</sub>/isopropanol (60:1), obteniéndose **64** como un aceite amarillo (0.07 g; Rdto. 67%).

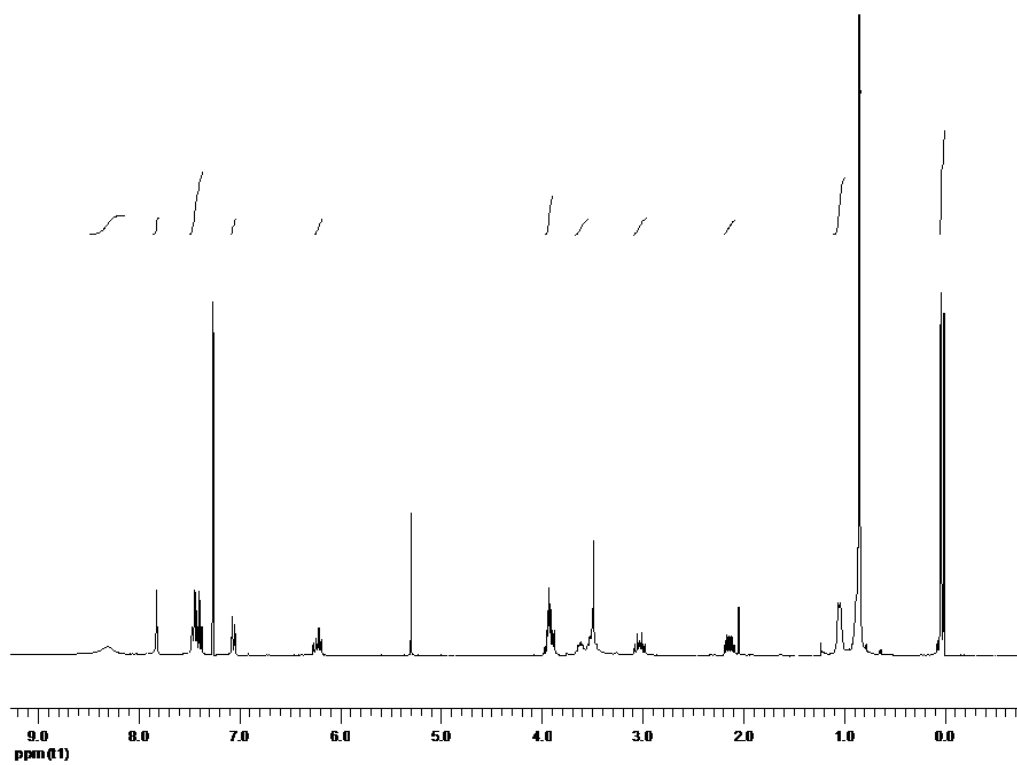
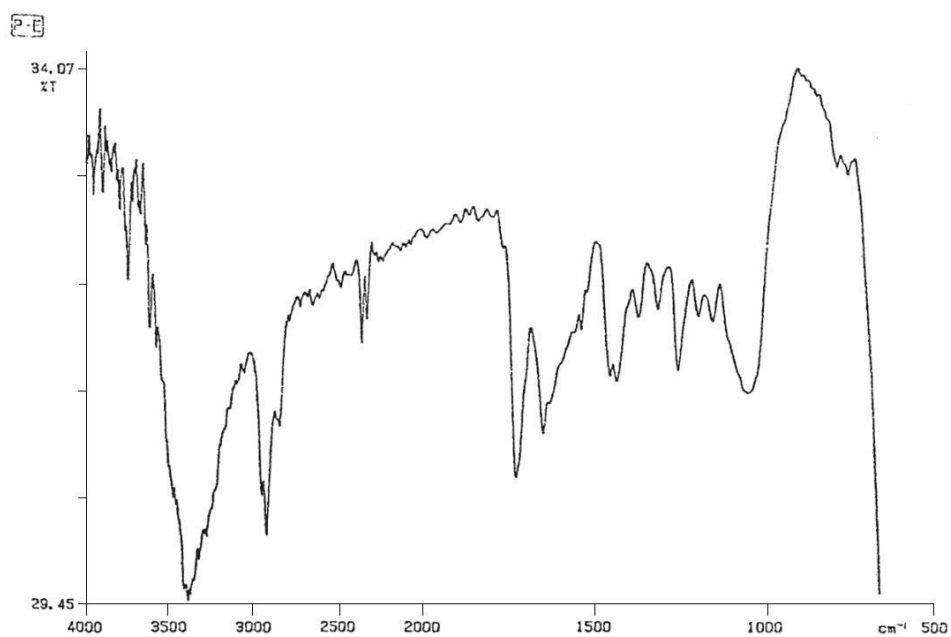
**Compuesto 64:** Aceite amarillo.

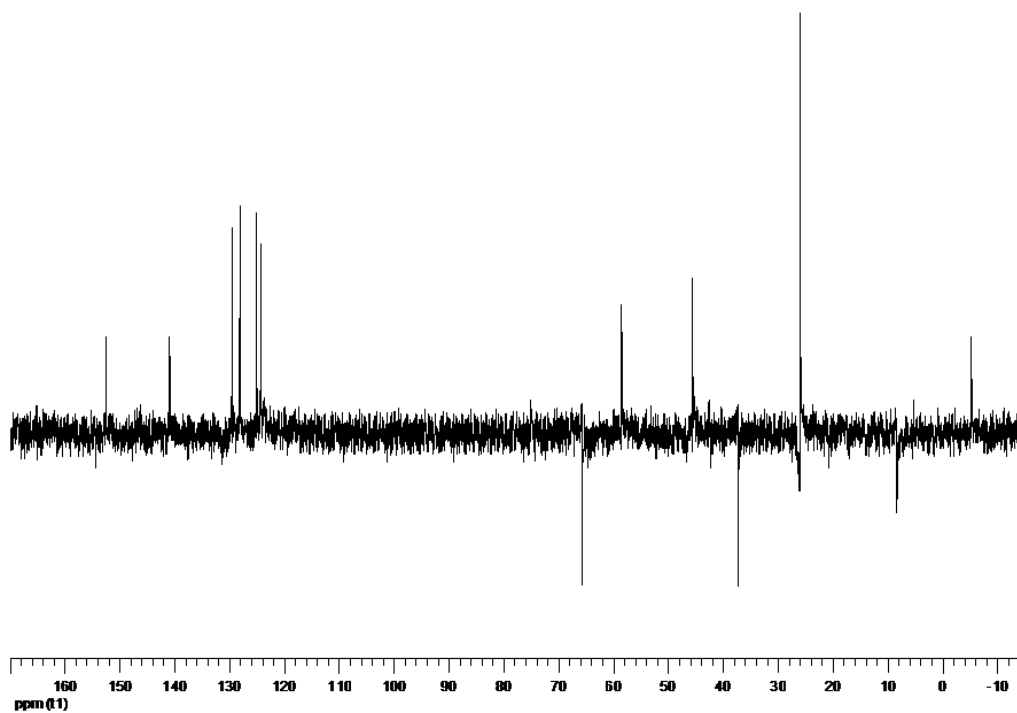
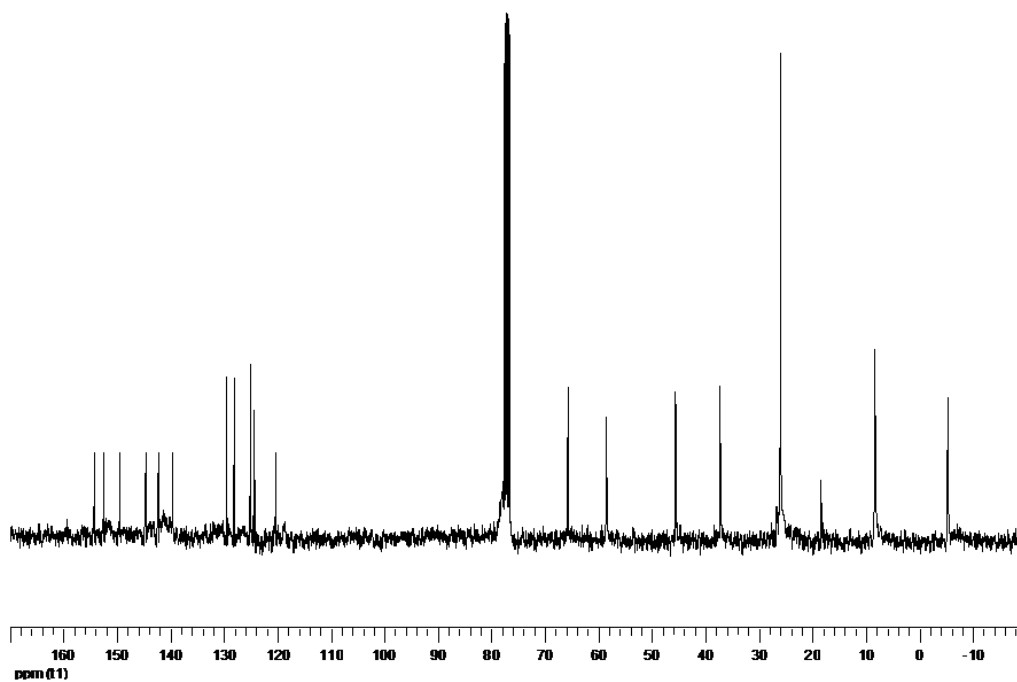
**IR (NaCl)**  $\nu$  = 3387, 1732, 1560, 1350, 1242, 1066 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 8.29 (s.a., 1H, NH, intercambia con D<sub>2</sub>O), 7.82 (s, 1H, 8'-H), 7.47-7.04 (m, 5H, 2'-H, H<sub>arom</sub>), 6.20 (t, 1H, J<sub>(t)</sub> = 7.6 Hz, 3 $\beta$ -H), 3.97-3.93 (Parte A de un sistema ABM, 1H, J<sub>AB</sub> = 11.1 Hz, J<sub>AM</sub> = 5.3 Hz, -CHHOSi), 3.92-3.87 (Parte B de un sistema ABM, 1H, J<sub>BA</sub> = 11.1 Hz, J<sub>BM</sub> = 5.3 Hz, -CHHOSi), 3.54-3.45 (m, 1H, CH-ciclopropilo), 3.02 (dt, 1H, J<sub>(t)</sub> = 13.7 Hz, J<sub>(d)</sub> = 8.4 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.13 (dt, 1H, J<sub>(t)</sub> = 13.7 Hz, J<sub>(d)</sub> = 7.1 Hz, 2 $\beta$ -H), 1.05-1.03 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-ciclopropilo), 0.83 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), -0.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

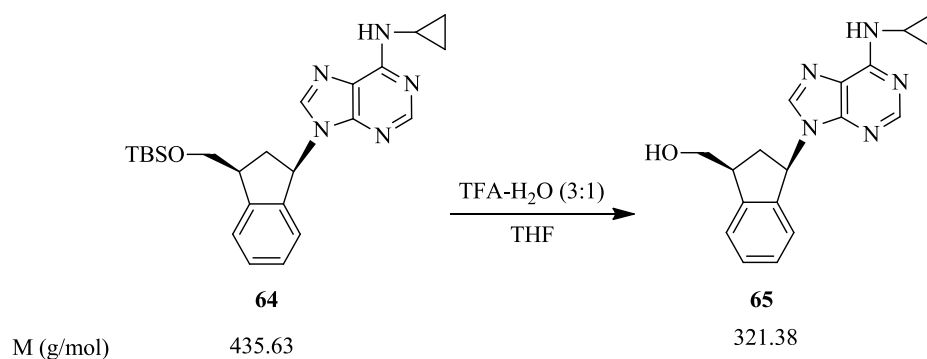
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 154.23 (C), 152.44 (CH), 149.41 (C), 144.61 (C), 142.25 (CH), 139.55 (C), 129.44, 128.06, 125.01 y 124.26 (CH), 120.26 (C), 66.32 (CH<sub>2</sub>), 65.55 (CH<sub>2</sub>), 58.37 (CH), 45.45 (CH), 37.09 (CH<sub>2</sub>), 30.57 (C), 25.84 (CH<sub>3</sub>), 18.33 (CH<sub>2</sub>), 8.14 (CH), -5.73 (CH<sub>3</sub>), -5.47 (CH<sub>3</sub>).

Análisis calculado para C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>OSi (435.64): C 66.17, H 7.64, N 16.08; encontrado C 65.91, H 7.87, N 16.24.





**4.10. (±)-cis-3-(6-N-Ciclopropilamino-9H-purin-9-il)-1-indanilmetanol (65).**



Sobre una disolución de **64** (0.06 g; 0.15 mmol) en THF (10 mL), se adicionó 6 mL de una mezcla de TFA-H<sub>2</sub>O (3:1) y se agitó durante 21 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo y por eliminación del exceso de disolvente por evaporación a vacío y mediante varias coevaporaciones con tolueno se aisló un aceite amarillo que, sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (5 g) utilizando como eluyente DCM/isopropanol (30:1), dio lugar al compuesto **65** como un sólido blanco (0.02 g; Rdto. 42%).

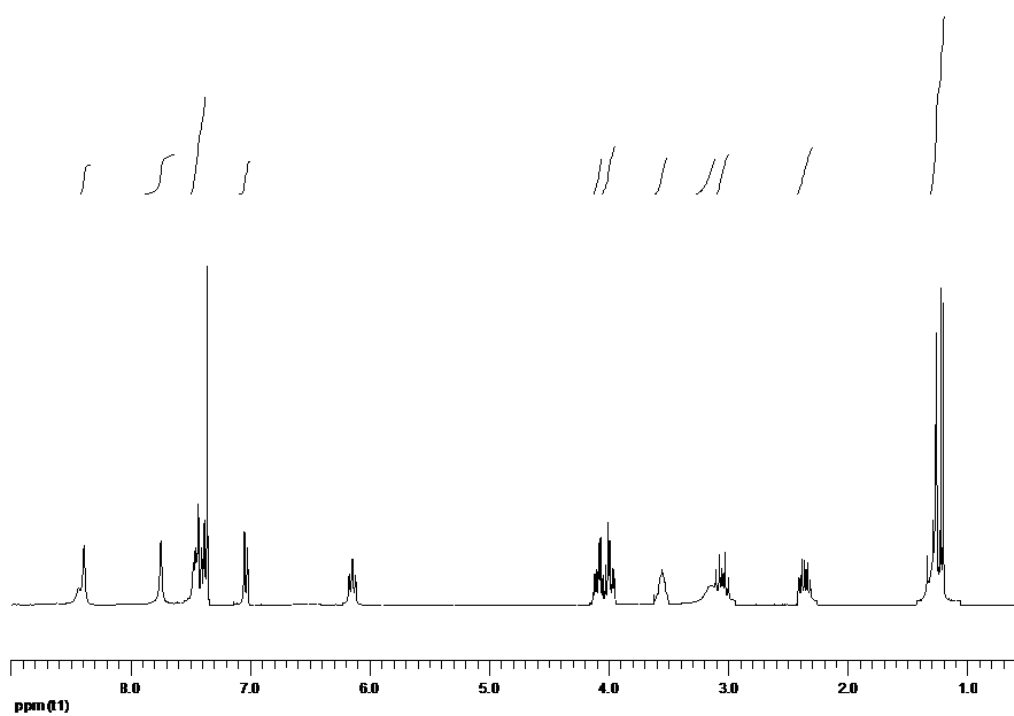
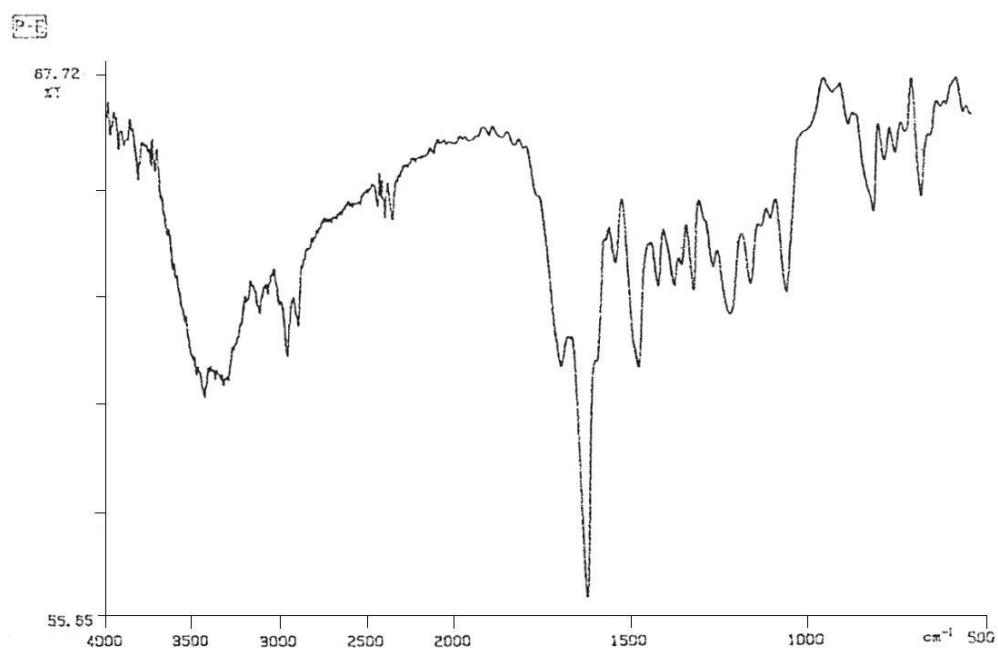
**Compuesto 65:** Sólido blanco, p.f. 187-191°C.

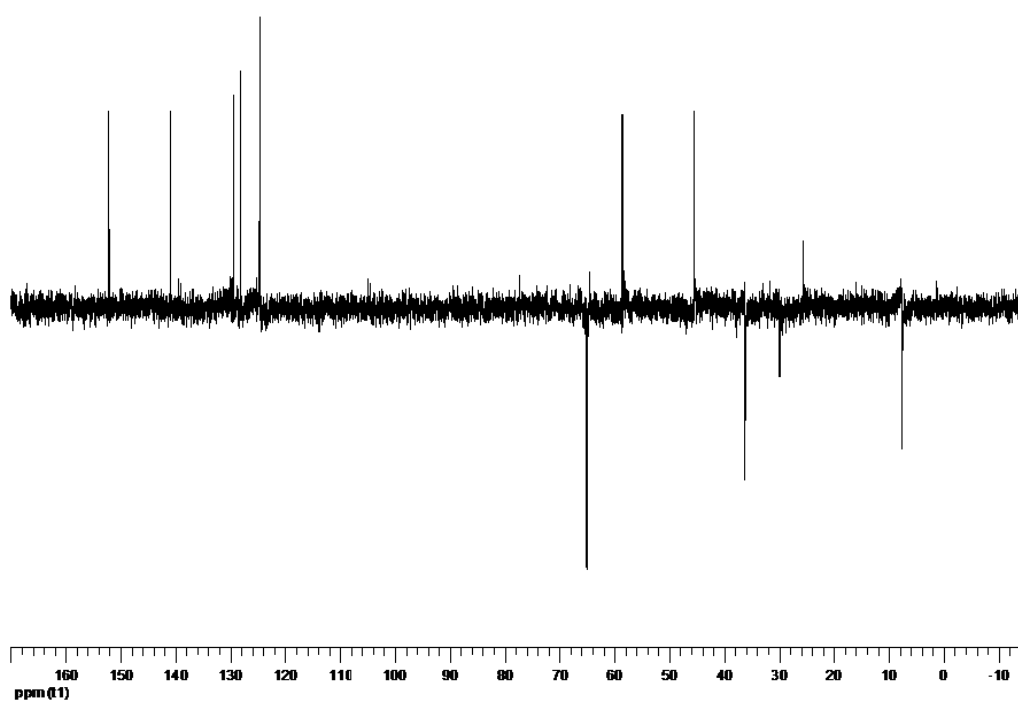
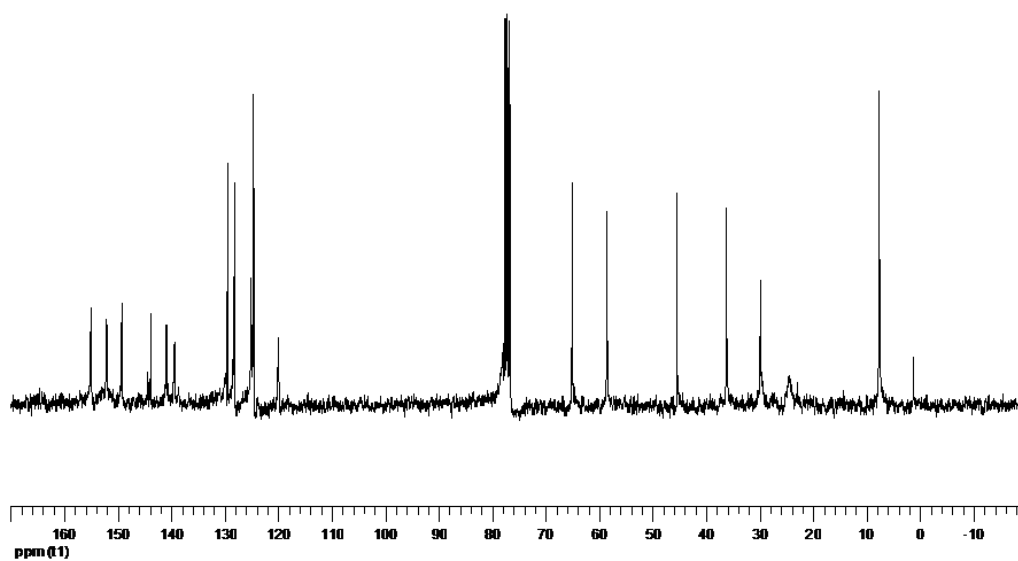
**IR (KBr)**  $\nu$  = 3394, 1618, 1458, 1198, 1038, 785 cm<sup>-1</sup>.

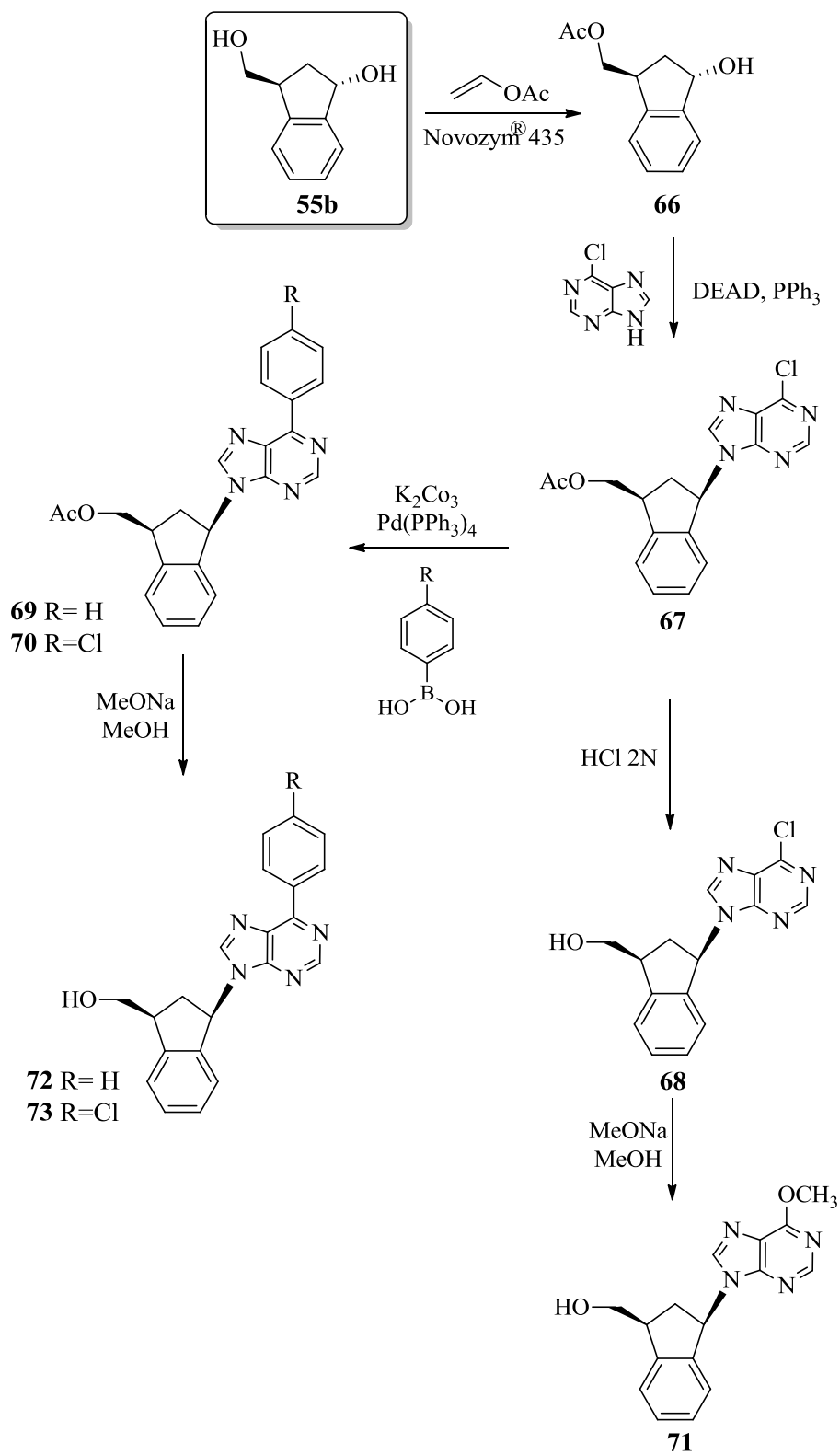
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 8.39 (m, 2H, 2'-H), 7.75 (m, 2H, 8'-H), 7.47-7.02 (m, 4H, H<sub>arom</sub>), 6.14 (t, 1H, J<sub>(t)</sub> = 7.8 Hz, 3-H), 4.11-4.06 (parte A de un sistema ABM, 1H, J<sub>AB</sub> = 10.9 Hz, J<sub>AM</sub> = 4.6 Hz, -CH<sub>2</sub>HOH), 4.04-3.98 (parte B de un sistema ABM, 1H, J<sub>BA</sub> = 10.9 Hz, J<sub>BM</sub> = 4.0 Hz, -CH<sub>2</sub>HOH), 3.59-3.51 (m, 1H, 1 $\beta$ -H), 3.14 (s.an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, OH), 3.05 (dt, 1H, J<sub>(t)</sub> = 13.9 Hz, J<sub>(d)</sub> = 8.9 Hz, 2 $\beta$ -H), 2.35 (dt, 1H, J<sub>(t)</sub> = 13.9 Hz, J<sub>(d)</sub> = 7.0 Hz, 2 $\alpha$ -H), 1.33-1.19 (m, 5H, ciclopropil-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, ciclopropil-CH).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 155.06 (C), 152.11 (CH), 149.22 (C), 143.81 (C), 140.91 (CH), 139.38 (C), 129.41, 128.10, 125.02 y 124.53 (CH), 119.97 (C), 64.96 (CH<sub>2</sub>), 58.31 (CH), 45.36 (CH), 36.07 (CH<sub>2</sub>), 29.75 (CH<sub>2</sub>), 7.50 (CH<sub>2</sub>).

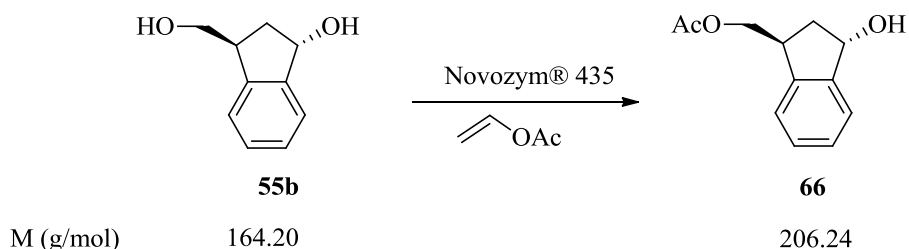
Análisis calculado para C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O (321.38): C 67.27, H 5.96, N 21.79; encontrado C 67.01, H 6.23, N 21.98.







#### 4.11. Acetato de (±)-*trans*-3-hidroxi-1-indanilmetilo (**66**).



Sobre una suspensión de la lipasa Novozym® 435 (0.14 g; 0.32 mmol) y el diol **55b** (0.55 g; 3.35 mmol) en THF (25 mL), a 0°C y bajo atmósfera de argón, se adicionó, gota a gota, una solución de acetato de vinilo (0.32 mL; 3.35 mmol) en THF (30 mL) y la mezcla resultante se agitó 4 horas a 0°C y a temperatura ambiente durante 68 horas. Transcurrido este tiempo, se filtró sobre celita y se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío, aislándose un aceite amarillo, que sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (30 g), empleando como fase móvil Hexano/AcOEt (8:1), proporcionó **66** bajo la forma de un aceite transparente (0.30 g; Rdto. 54%).

**Compuesto 66:** Aceite transparente.

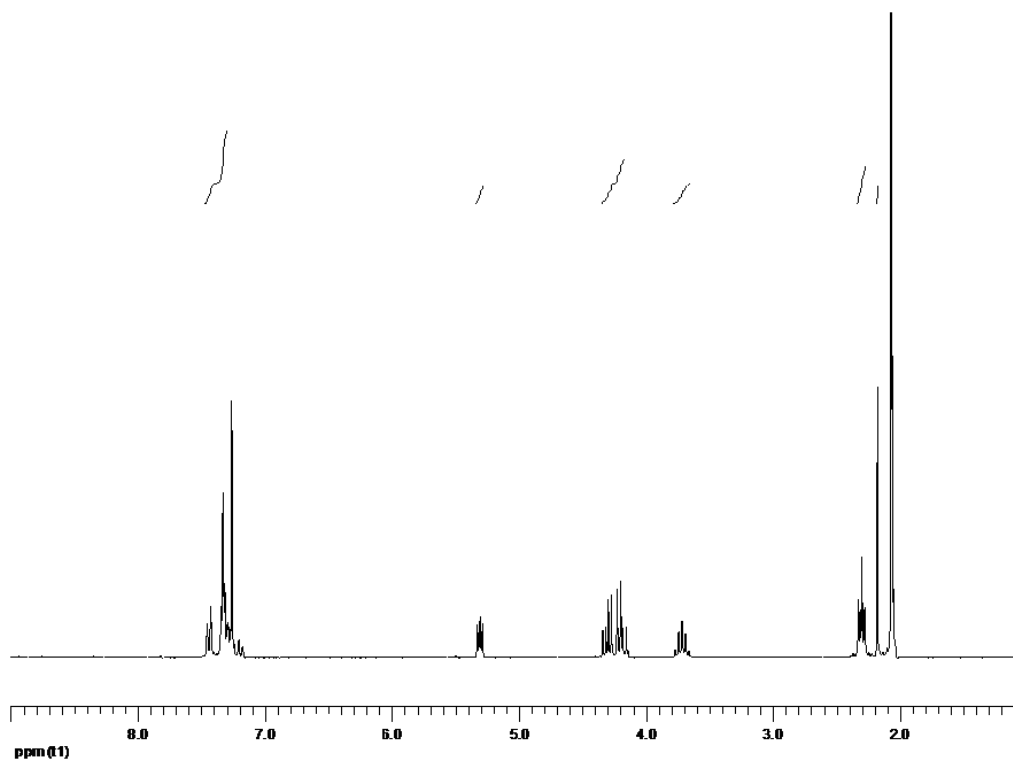
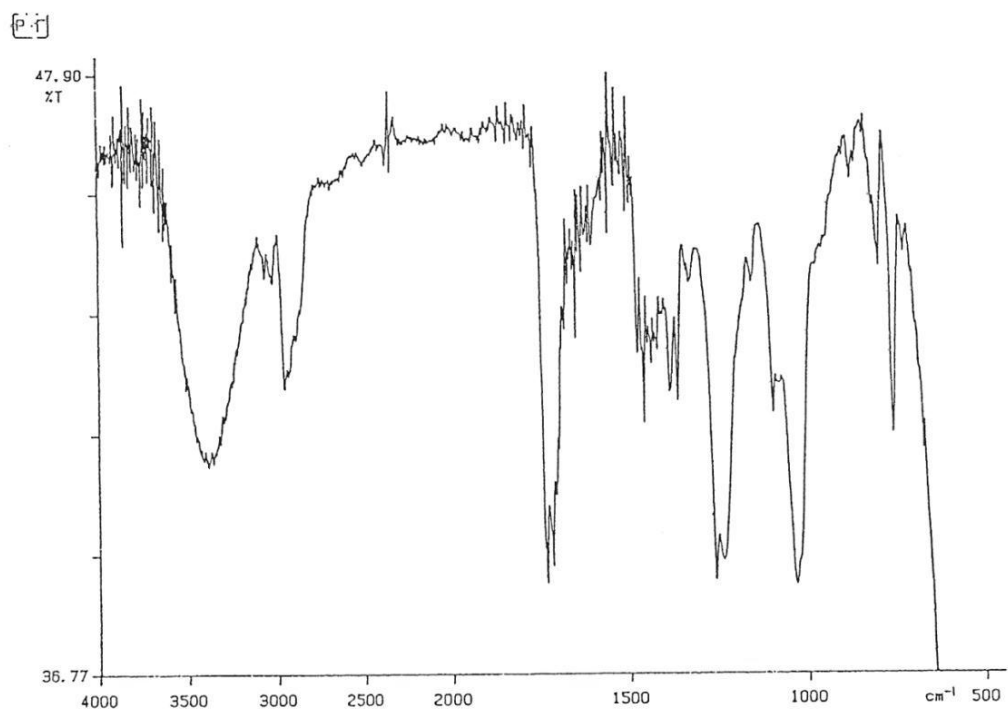
**IR (NaCl)**  $\nu = 3385, 1734, 1556, 1458, 1349, 1259, 1134, 1034 \text{ cm}^{-1}$

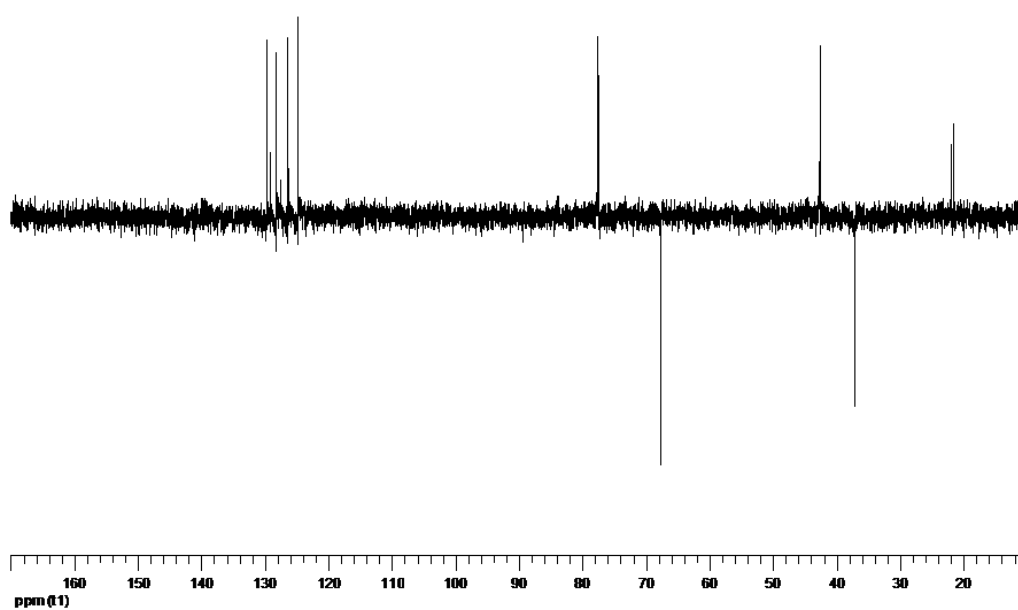
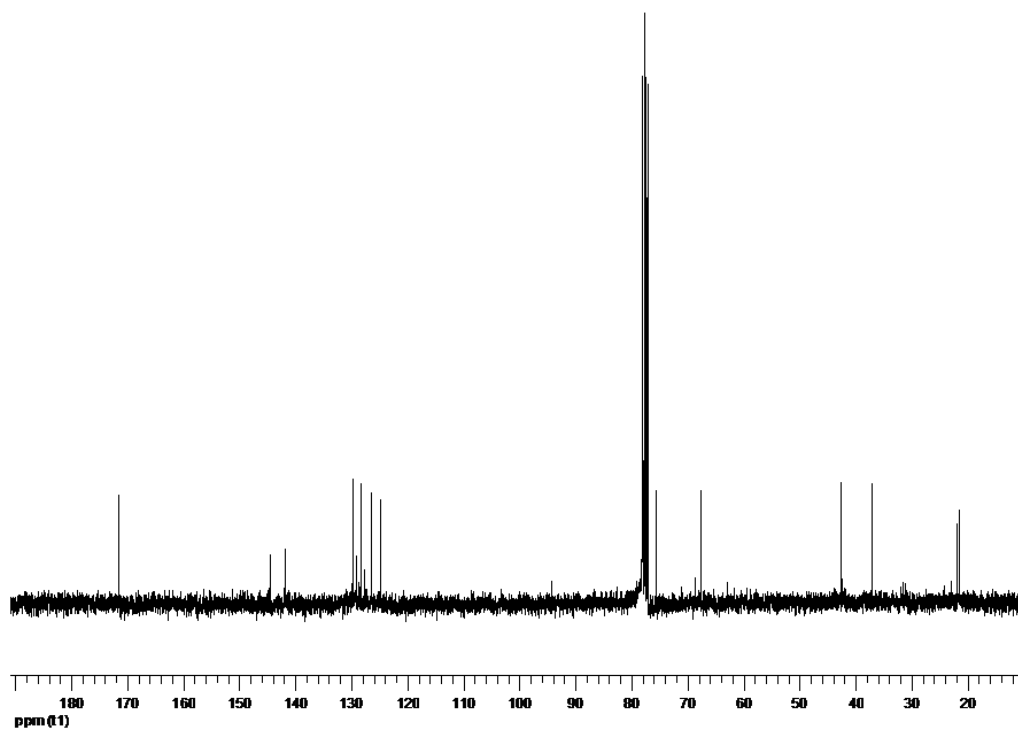
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta = 7.45\text{-}7.29$  (m, 4H, H<sub>arom</sub>), 5.30 (dd, 1H,  $J_{gem} = 5.7 \text{ Hz}$ ,  $J_{vec} = 4.4 \text{ Hz}$ , 3 $\alpha$ -H), 4.34-4.14 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OAc), 3.77-3.66 (m, 1H, 1 $\beta$ -H), 2.67-2.32 (m, 2H, 2 $\beta$ -H, 2 $\alpha$ -H), 2.17 (s.an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, OH), 2.06 (d, 3H,  $J_{(d)} = 1.7 \text{ Hz}$ , CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta = 171.44$  (C), 144.49 (C), 141.83 (C), 129.71, 128.21, 126.33 y 124.74 (CH), 75.48 (CH), 67.53 (CH<sub>2</sub>), 42.46 (CH), 36.96 (CH<sub>2</sub>), 21.34 (CH<sub>3</sub>).

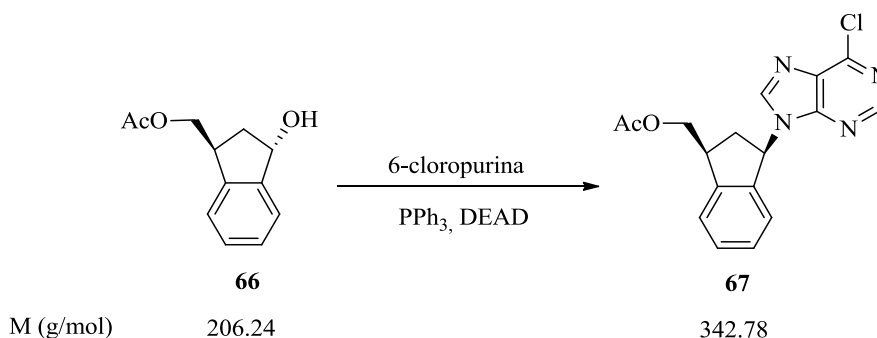
Análisis calculado para C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> (206.24): C 69.88, H 6.84; encontrado C 69.45, H 6.99.







**4.12. Acetato de (±)-cis-3-(6-cloro-9H-purin-9-il)-1-indanilmetilo (67).**



Sobre una disolución de **66** (0.42 g; 2.03 mmol), PPh<sub>3</sub> (1.07 g; 4.06 mmol) y 6-cloropurina (0.63 g; 4.06 mmol) en THF (20 mL), bajo atmósfera de argón y a 0°C, se añadió, gota a gota, una solución de DEAD (1.86 mL; 4.06 mmol) en THF (15 mL). La mezcla resultante se agitó a 0°C una hora y a temperatura ambiente 65 horas, finalizadas las cuales se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío, aislándose un sólido que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (113 g), utilizando como eluyente Hexano/AcOEt (2:1), obteniéndose un aceite que cristaliza espontáneamente bajo la forma de un sólido blanco (0.17 g; Rdto. 46%) que fue identificado de manera inequívoca como el compuesto **67**.

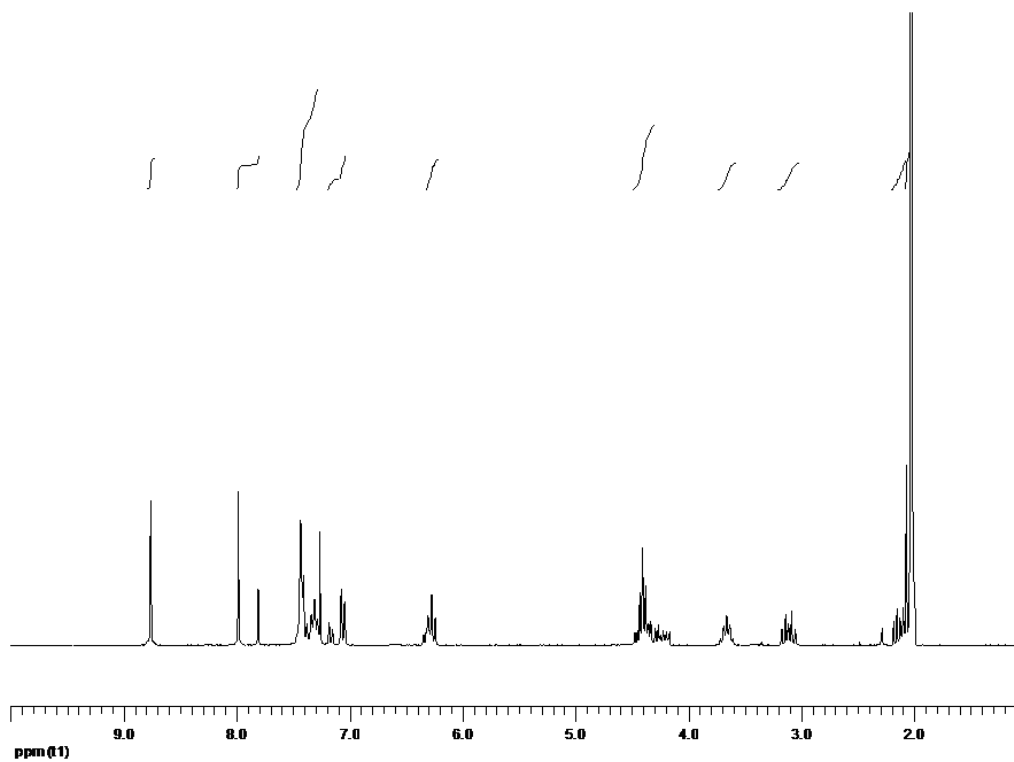
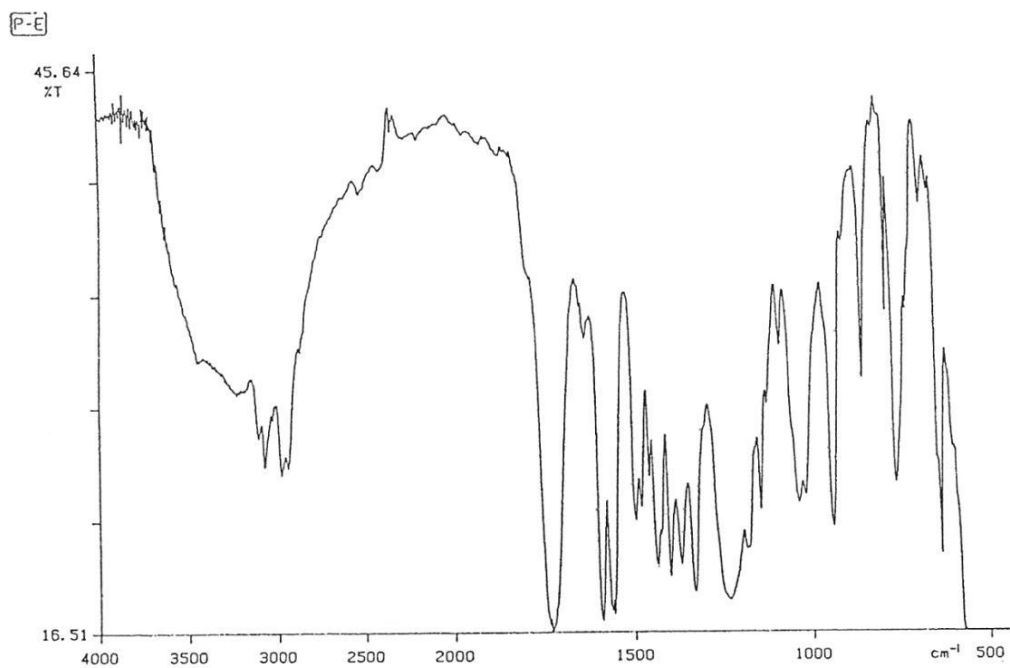
**Compuesto 67:** Sólido blanco, p.f. 35-38°C.

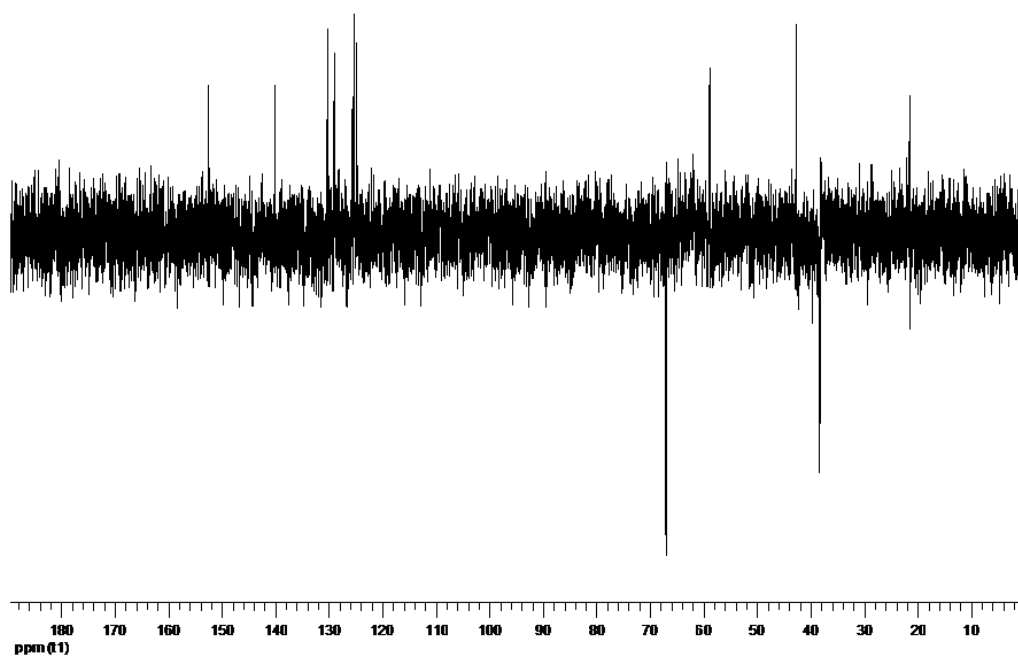
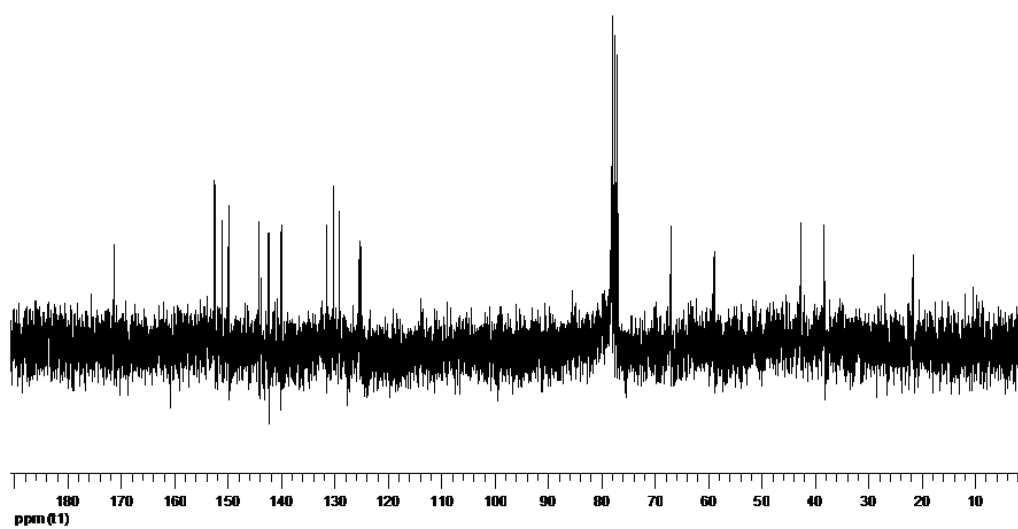
**IR (KBr)**  $\nu$  = 2979, 1731, 1591, 1436, 1402, 1354, 1236, 1040 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 8.76 (s, 1H, 2'-H), 7.98-7.81 (s, 1H, 8'-H), 7.43-7.04 (m, 4H, H<sub>arom</sub>), 6.34-6.24 (m, 1H, 3 $\beta$ -H), 4.47-4.32 (Parte A de un sistema ABM, 1H,  $J_{AB}$  = 11.7 Hz,  $J_{AM}$  = 6.6 Hz, -CHH<sub>2</sub>OAc), 4.31-4.26 (Parte B de un sistema ABM, 1H,  $J_{BA}$  = 11.7 Hz,  $J_{BM}$  = 6.9 Hz, -CHH<sub>2</sub>OAc), 3.71-3.63 (m, 1H, 1 $\beta$ -H), 3.16-3.04 (dt, 1H,  $J_{(t)}$  = 13.6 Hz,  $J_{(d)}$  = 8.3 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.17-2.08 (dt, 1H,  $J_{(t)}$  = 13.6 Hz,  $J_{(d)}$  = 7.7 Hz, 2 $\beta$ -H), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

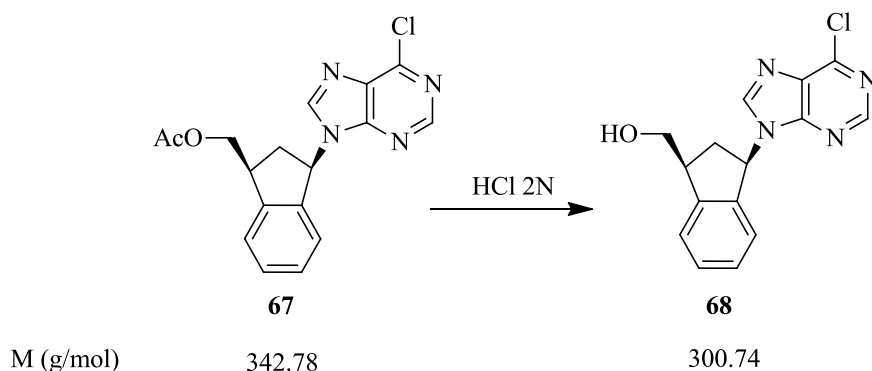
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 171.30 (C), 152.42 (CH), 151.02 (C), 149.81 (C), 142.29 (C), 140.08 (CH), 139.75 (C), 131.41 (C), 130.14, 128.96, 125.23 y 124.86 (CH), 66.89 (CH<sub>2</sub>), 58.74 (CH), 42.49 (CH), 38.09 (CH<sub>2</sub>), 21.34 (CH<sub>3</sub>).

Análisis calculado para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (342.78): C 59.57, H 4.41, N 16.34; encontrado C 59.12, H 4.56, N 16.41.





**4.13. (±)-cis-3-(6-Cloro-9H-purin-9-il)-1-indanilmetanol (68).**



Sobre una disolución de **67** (0.17 g; 0.51 mmol) en THF se adicionó una solución de HCl 2N (10 mL) y la mezcla resultante se agitó durante 20 horas a 40°C. Transcurrido este tiempo, se neutralizó la mezcla con NaOH 2N (12 mL) y se rotó para eliminar el exceso de disolvente por evaporaciones a vacío y mediante varias coevaporaciones con tolueno y etanol, al cabo de las cuales se aisló un sólido blanco que sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (50 g), empleando como eluyente Hexano/AcOEt (1:3), proporcionó el compuesto **68** como un sólido blanco (0.06 g; Rdto. 40%).

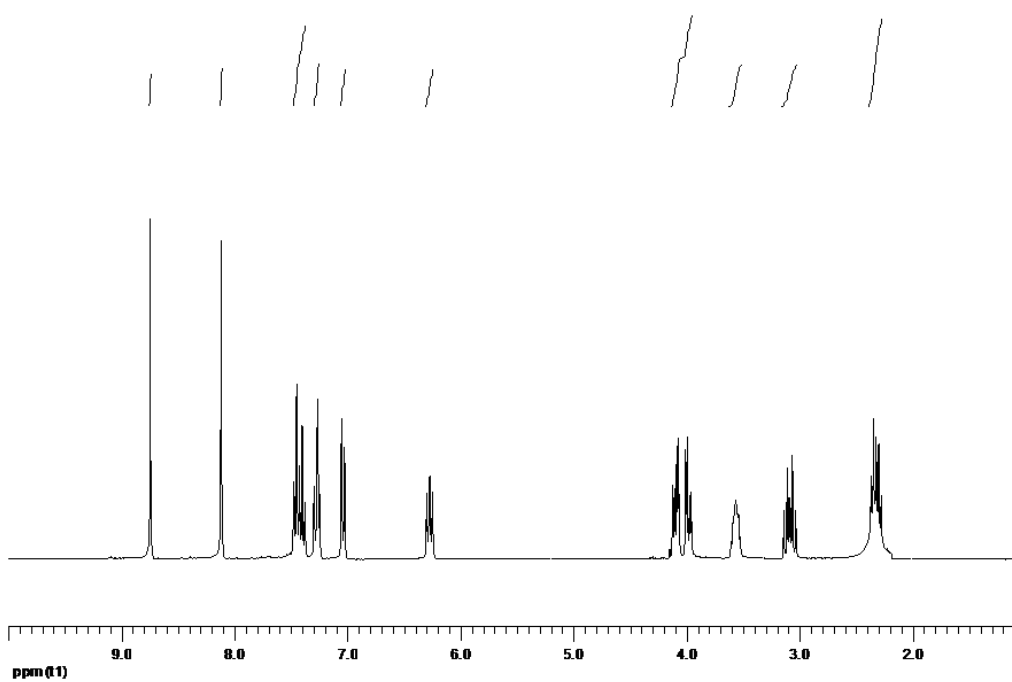
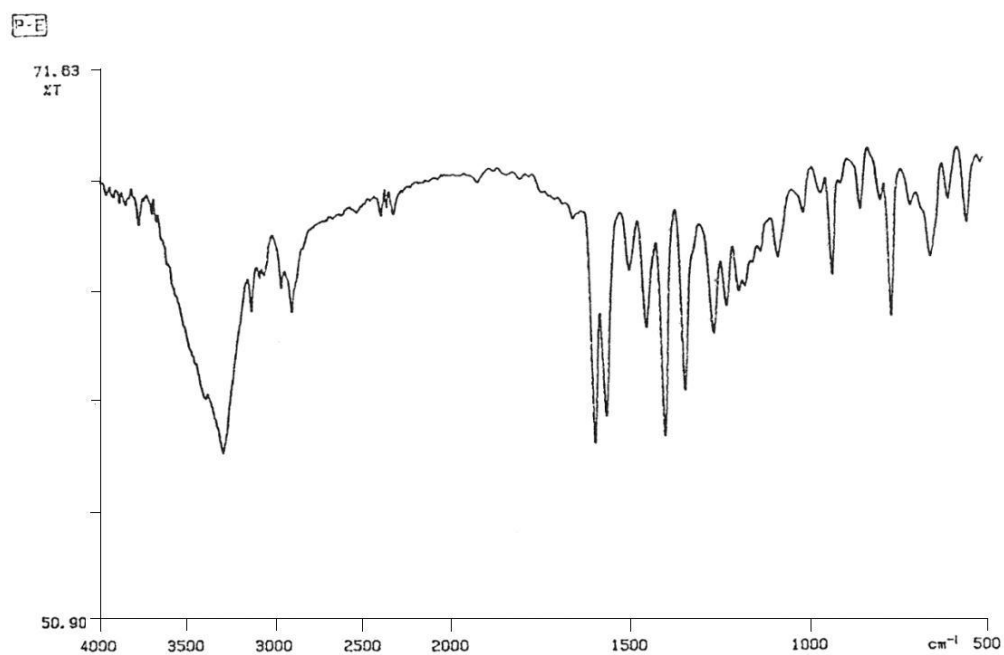
**Compuesto 68:** Sólido blanco, p.f. 147-149°C

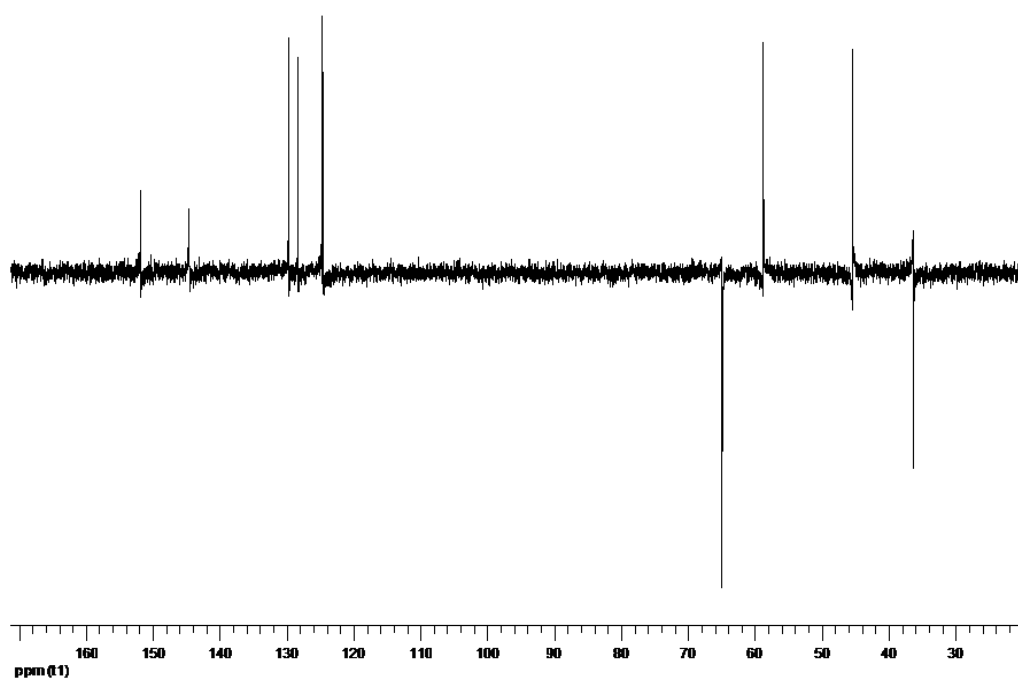
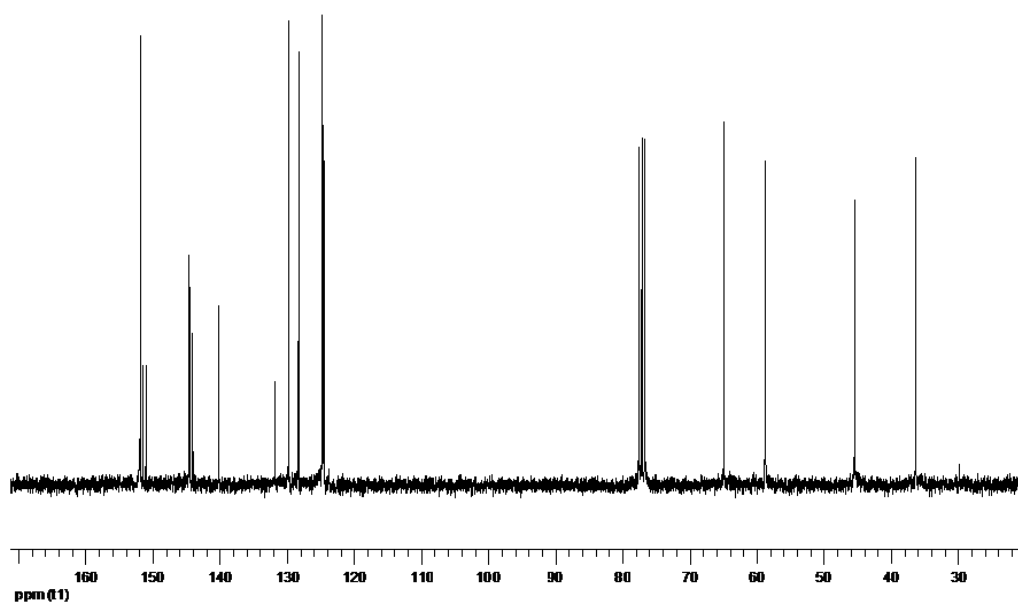
**IR (KBr)**  $\nu = 3285, 2887, 1561, 1446, 1339, 1259, 927 \text{ cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 8.75$  (s, 1H, 2'-H), 8.12 (s, 1H, 8'-H), 7.47-7.02 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.27 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 8.5 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{vec}} = 6.8 \text{ Hz}$ , 3 $\beta$ -H), 4.12-3.95 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.60-3.52 (m, 1H, 1 $\beta$ -H), 3.08 (dt, 1H,  $J_{\text{t}} = 13.9 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{d}} = 8.8 \text{ Hz}$ , 2 $\alpha$ -H), 2.31 (dt, 2H,  $J_{\text{t}} = 14.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{d}} = 6.5 \text{ Hz}$ , 2 $\beta$ -H, OH, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 151.80$  (CH), 151.47 (C), 150.99 (C), 144.52 (CH), 144.01 (C), 140.10 (C), 131.71 (C), 129.66, 128.22, 124.67 y 124.47 (CH), 64.80 ( $\text{CH}_2$ ), 58.63 (CH), 45.28 (CH), 36.19 ( $\text{CH}_2$ ).

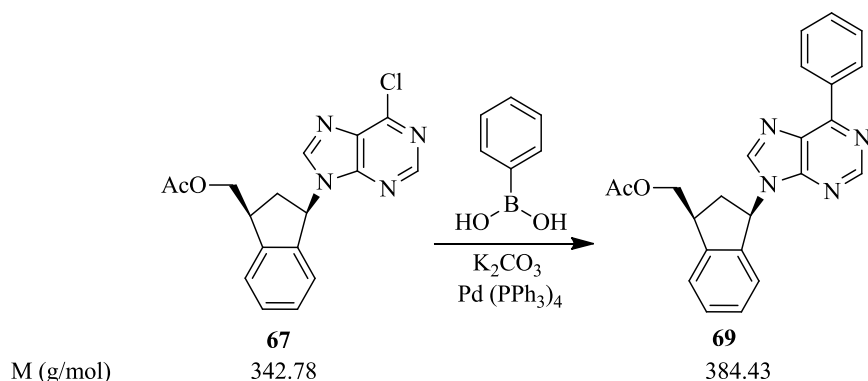
Análisis calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}$  (300.74): C 59.91, H 4.36, N 18.63; encontrado C 59.58, H 4.64, N 18.83.







#### 4.14. Acetato de (±)-cis-3-(6-fenil-9H-purin-9-il)-1-indanilmetilo (69).



Una mezcla de **67** (0.15 g; 0.83 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.08 g; 0.67 mmol), ácido 6-fenilborónico (0.09 g; 0.67 mmol) y  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.05 g) en tolueno anhidro (80 mL) y bajo atmósfera de argón, fue agitada durante 12h a  $100^\circ\text{C}$ . A continuación el disolvente fue eliminado por destilación a vacío y el residuo obtenido fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (48 g) eluyendo con Hexano/ $\text{AcOEt}$  (4:1), obteniéndose **69** como un aceite amarillo que espontáneamente cristaliza como un sólido blanco (0.08 g; Rdto. 46%).

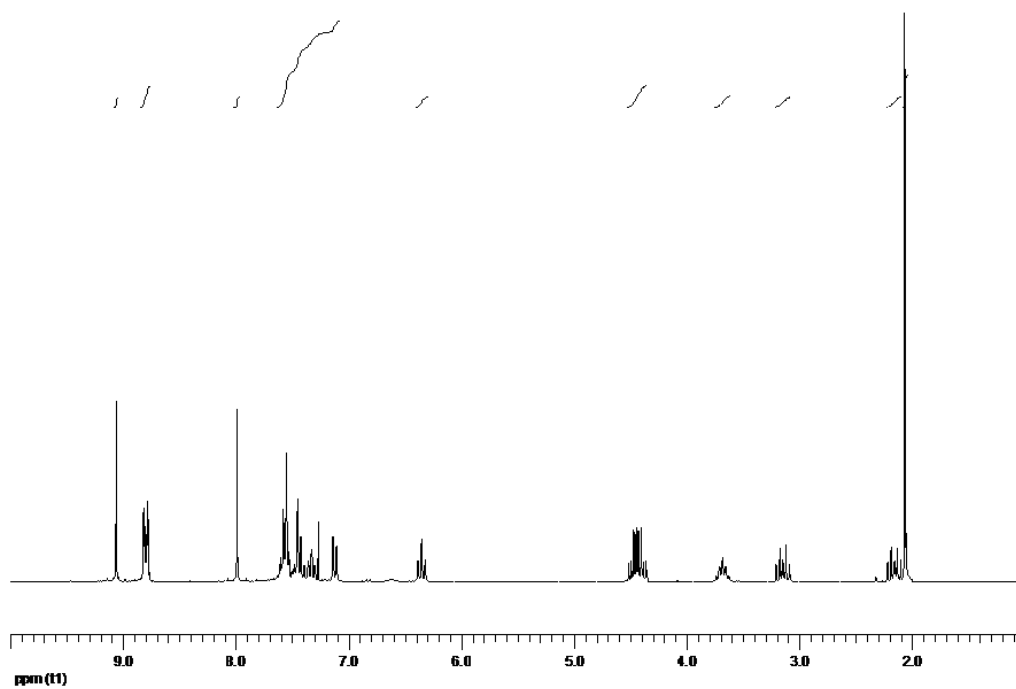
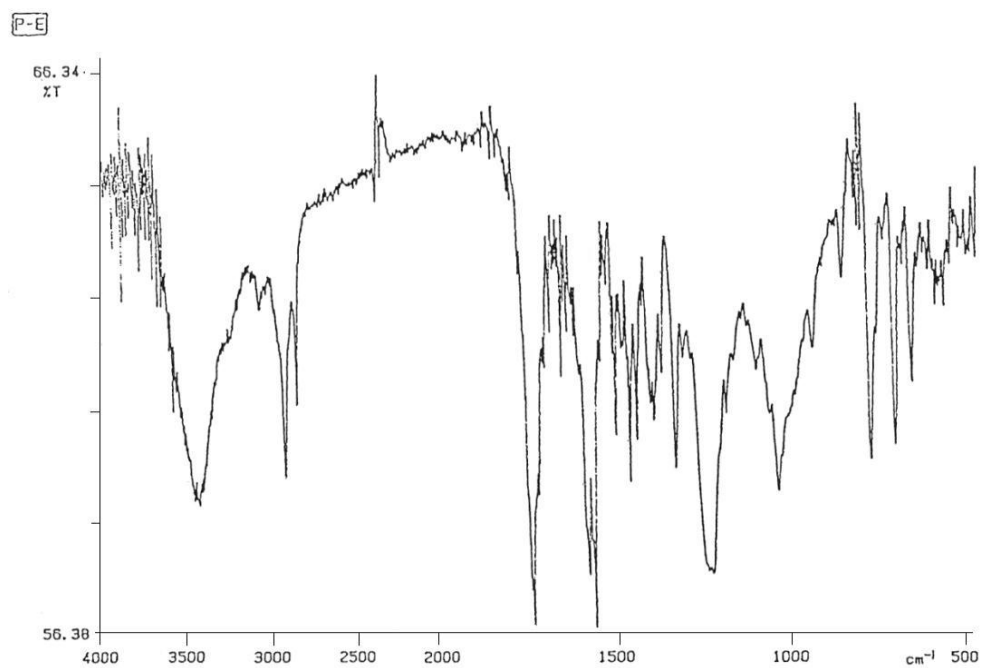
**Compuesto 69:** Sólido blanco, p.f.  $38\text{--}41^\circ\text{C}$  ( $\text{CHCl}_3$ /Hexano).

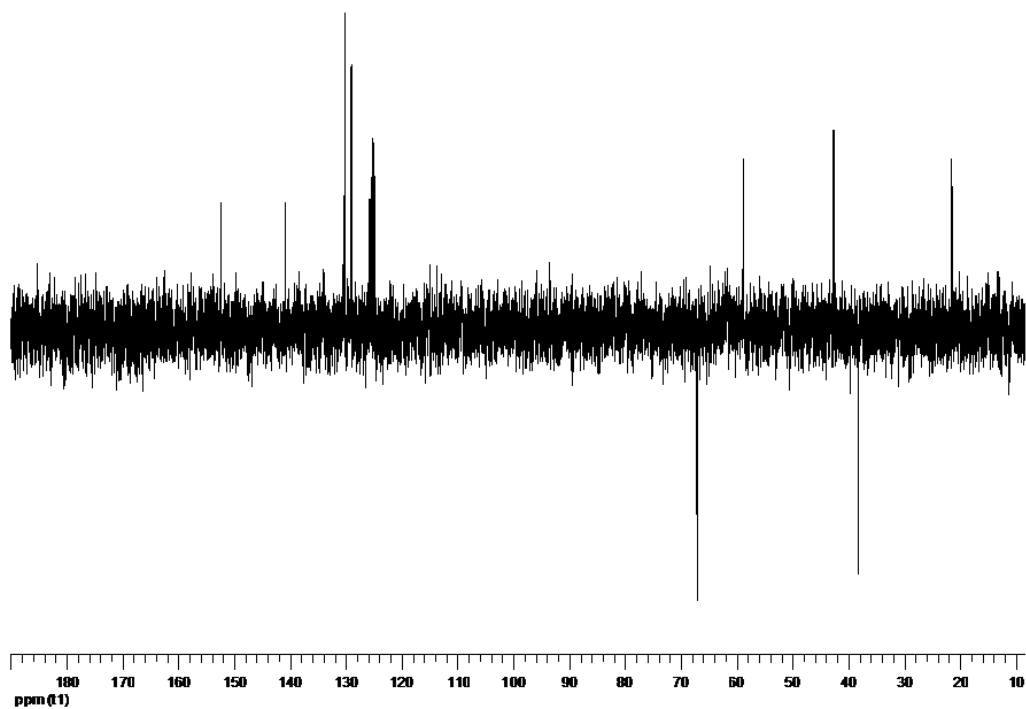
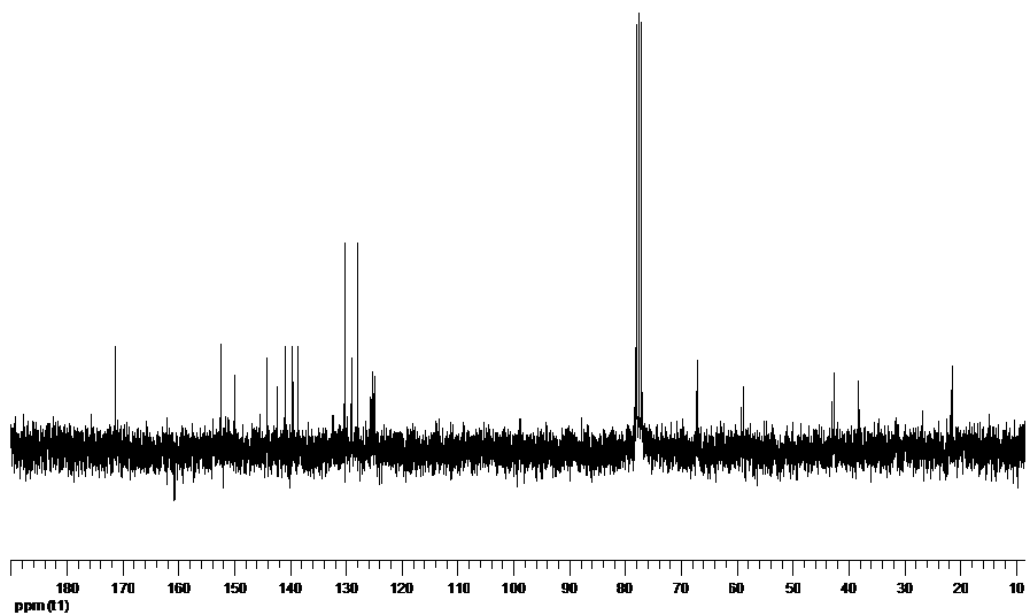
**IR (KBr)**  $\nu = 3418, 2919, 1734, 1649, 1536, 1457, 1351, 1223, 1021 \text{ cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 9.06$  (s, 1H, 2'-H), 8.81-8.78 (d, 2H,  $J = 7.6 \text{ Hz}$ ,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.98 (s, 1H, 8'-H), 7.61-7.26 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.13-7.10 (d, 1H,  $J = 7.6 \text{ Hz}$ ,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.38-6.31 (t, 1H,  $J = 7.9 \text{ Hz}$ ,  $3\beta\text{-H}$ ), 4.51-4.44 (Parte A de un sistema ABM, 1H,  $J_{AB} = 11.11 \text{ Hz}$ ,  $J_{AM} = 5.6 \text{ Hz}$ ,  $-\text{CHH}\text{OAc}$ ), 4.42-4.35 (Parte B de un sistema ABM, 1H,  $J_{BA} = 11.1 \text{ Hz}$ ,  $J_{BM} = 6.3 \text{ Hz}$ ,  $-\text{CHH}\text{OAc}$ ), 3.73-3.62 (m, 1H,  $1\beta\text{-H}$ ), 3.20-3.08 (dt, 1H,  $J_{(t)} = 13.5 \text{ Hz}$ ,  $J_{(d)} = 8.2 \text{ Hz}$ ,  $2\alpha\text{-H}$ ), 2.21-2.09 (dt, 1H,  $J_{(t)} = 13.5 \text{ Hz}$ ,  $J_{(d)} = 7.8 \text{ Hz}$ ,  $2\beta\text{-H}$ ), 2.05 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

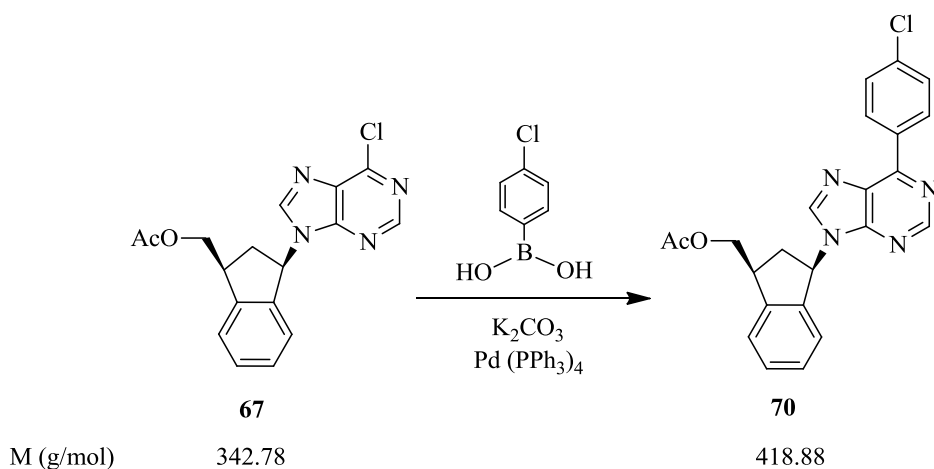
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 171.30$  (C), 152.41 (CH), 149.81 (C), 144.09 (C), 142.29 (C), 140.86 (CH), 139.50 (C), 138.60 (C), 130.14, 129.15, 128.86, 125.67, 125.34, 125.23 y 124.86 (CH), 66.88 (CH), 58.02 ( $\text{CH}_2$ ), 42.49 (CH), 38.09 ( $\text{CH}_2$ ), 21.29 ( $\text{CH}_3$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$  (384.43): C 71.86, H 5.24, N 14.57; encontrado C 71.69, H 5.42, N 14.65.





**4.15. Acetato de (±)-cis-3-[6-(4'-clorofenil)-9H-purin-9-il]-1-indanilmetilo (70).**



A partir de **67**, por reacción con ácido 6-clorofenilborónico, siguiendo idéntico procedimiento al descrito en el apartado **4.14** fue obtenido el compuesto **70** bajo el aspecto de un aceite claro que espontáneamente cristaliza como un sólido blanco. (Rdto. 65%).

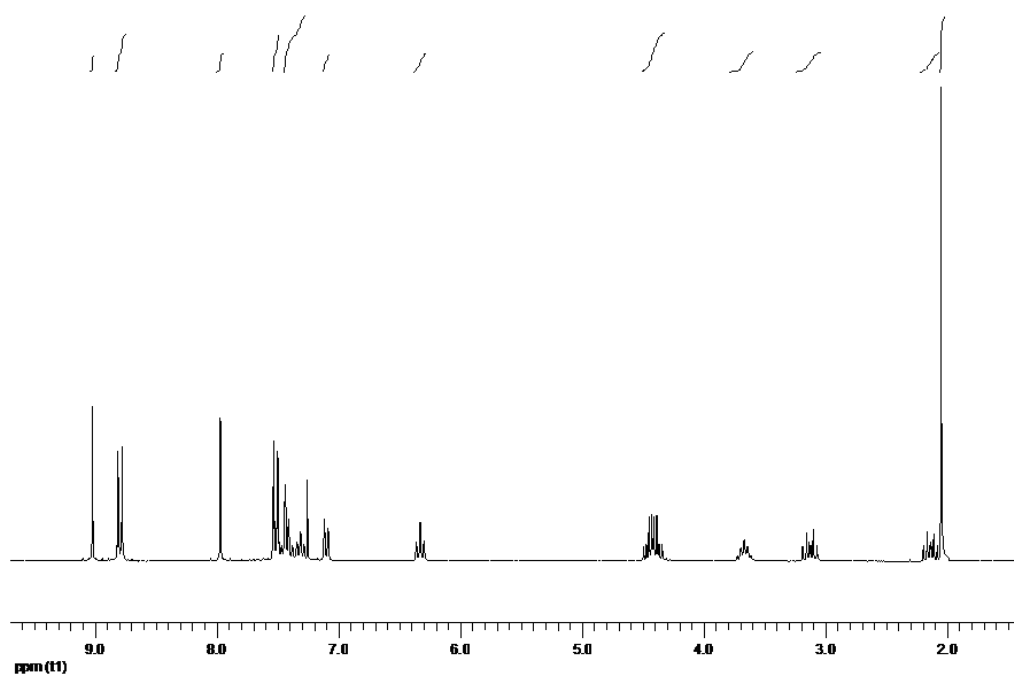
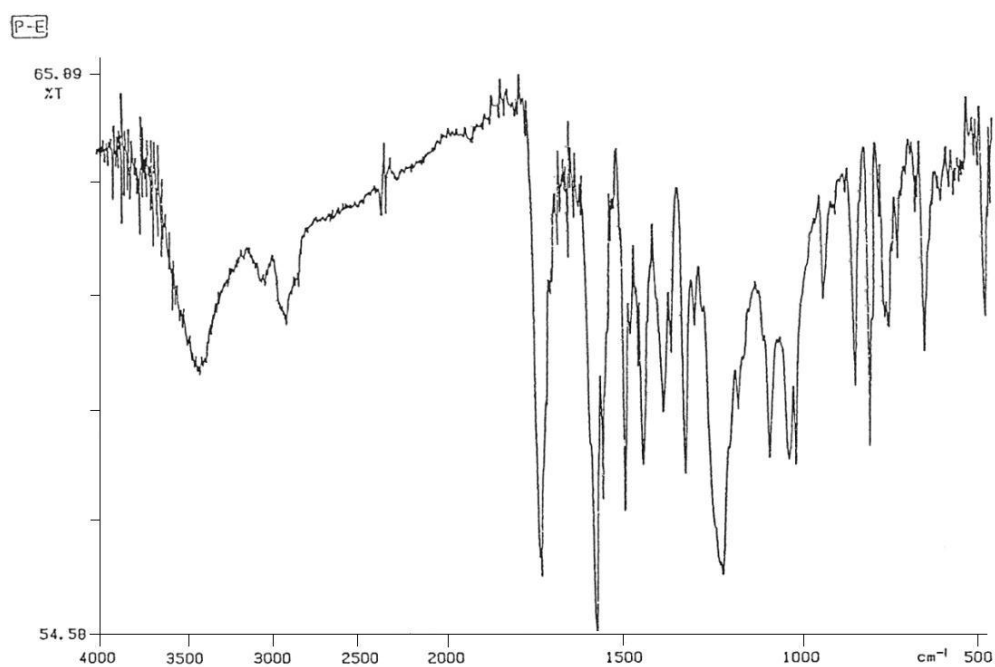
**Compuesto 70:** Sólido blanco, p.f. 60-63°C (CHCl<sub>3</sub>/Hexano).

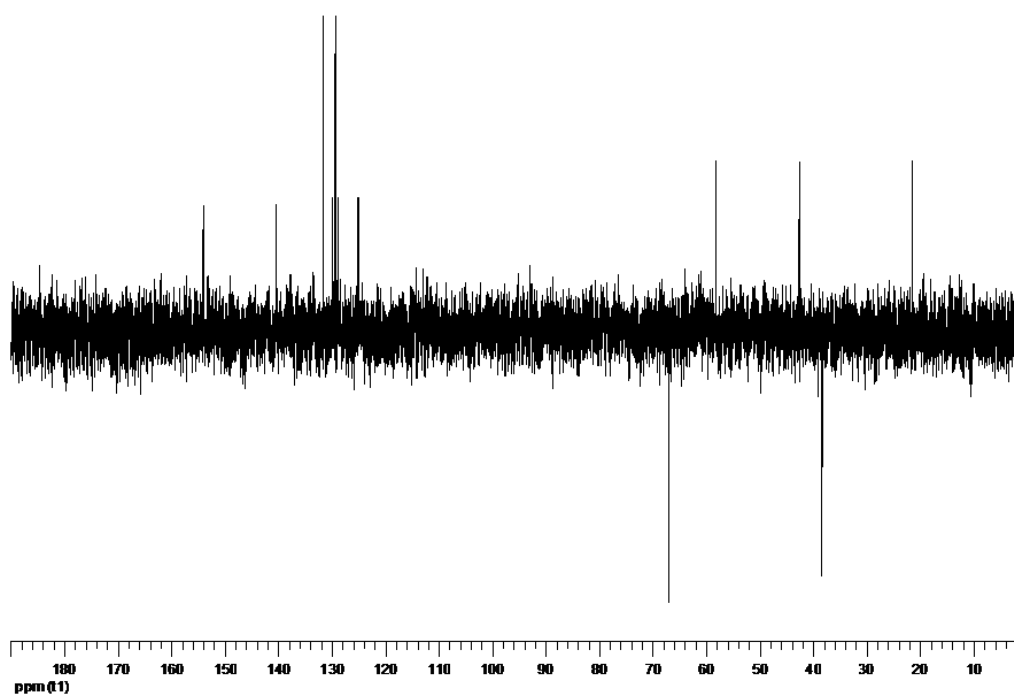
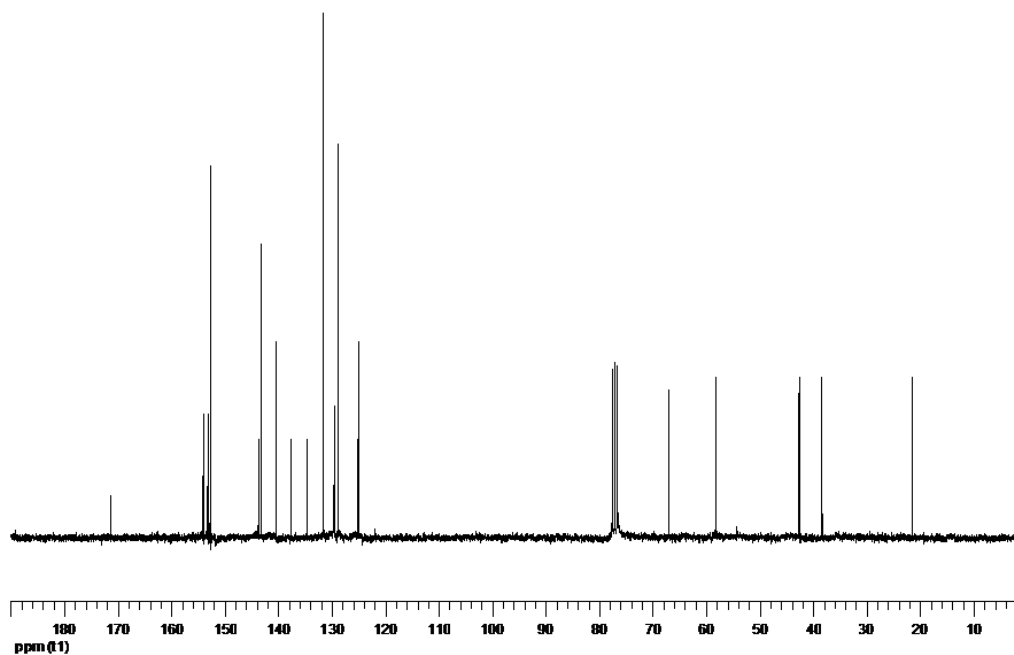
**IR (KBr)**  $\nu$  = 3412, 1734, 1649, 1514, 1445, 1325, 1221, 1014 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 9.02 (s, 1H, 2'-H), 8.80 (d, 2H,  $J$  = 8.6 Hz, H<sub>arom</sub>), 7.97 (s, 1H, 8'-H), 7.53-7.50 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.49-7.26 (m, 3H, H<sub>arom</sub>), 7.10 (d, 1H,  $J$  = 7.6 Hz, H<sub>arom</sub>), 6.34 (t, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, 3 $\beta$ -H), 4.48-4.43 (Parte A de un sistema ABM, 1H,  $J_{AB}$  = 11.1 Hz,  $J_{AM}$  = 5.9 Hz, -CHHOAc), 4.41-4.35 (Parte B de un sistema ABM, 1H,  $J_{BA}$  = 11.1 Hz,  $J_{AM}$  = 6.3 Hz, -CHHOAc), 3.71-3.64 (m, 1H, 1 $\beta$ -H), 3.12 (dt, 1H,  $J_{(t)}$  = 13.6 Hz,  $J_{(d)}$  = 8.1 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.14 (dt, 1H,  $J_{(t)}$  = 13.6 Hz,  $J_{(d)}$  = 7.7 Hz, 2 $\beta$ -H), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

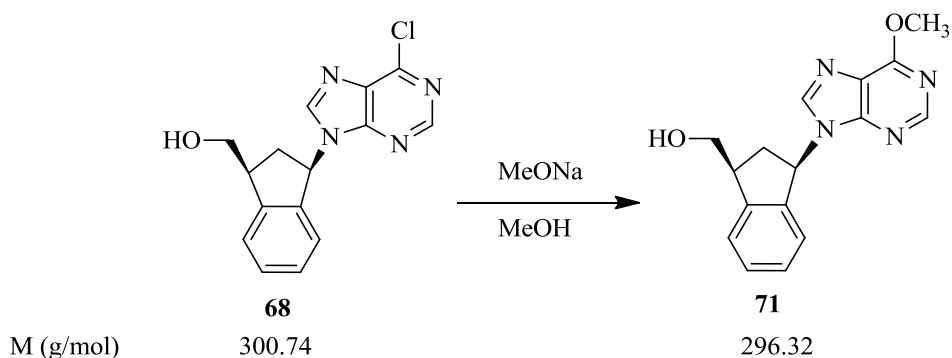
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 171.28 (C), 154.02 (CH), 153.14 (C), 152.64 (C), 143.67 (C), 143.22 (C), 140.22 (C), 140.37 (CH), 137.67 (C), 134.56 (C), 131.58, 131.52, 129.51, 129.36, 128.82, 125.17 y 124.91 (CH), 66.90 (CH<sub>2</sub>), 58.07 (CH), 42.47 (CH), 38.21 (CH<sub>2</sub>), 21.27 (CH<sub>3</sub>).

Análisis calculado para C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (418.88): C 65.95, H 4.57, N 13.38; encontrado C 65.73, H 4.79, N 13.49.





**4.16. (±)-cis-3-(6-Metoxi-9H-purin-9-il)-1-indanilmetanol (71).**



Sobre una disolución de **68** (0.03 g; 0.10 mmol) en MeOH (10 mL) se adicionó, bajo atmósfera de argón, MeONa (0.11 mL; 0.11 mmol) y la mezcla se agitó 6 h a temperatura ambiente, finalizadas las cuales el disolvente fue eliminado por destilación a vacío y el residuo fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (3 g), utilizando como eluyente DCM/isopropanol (30:1), obteniéndose **71** como un sólido blanco (0.03 g; Rdto. 99%).

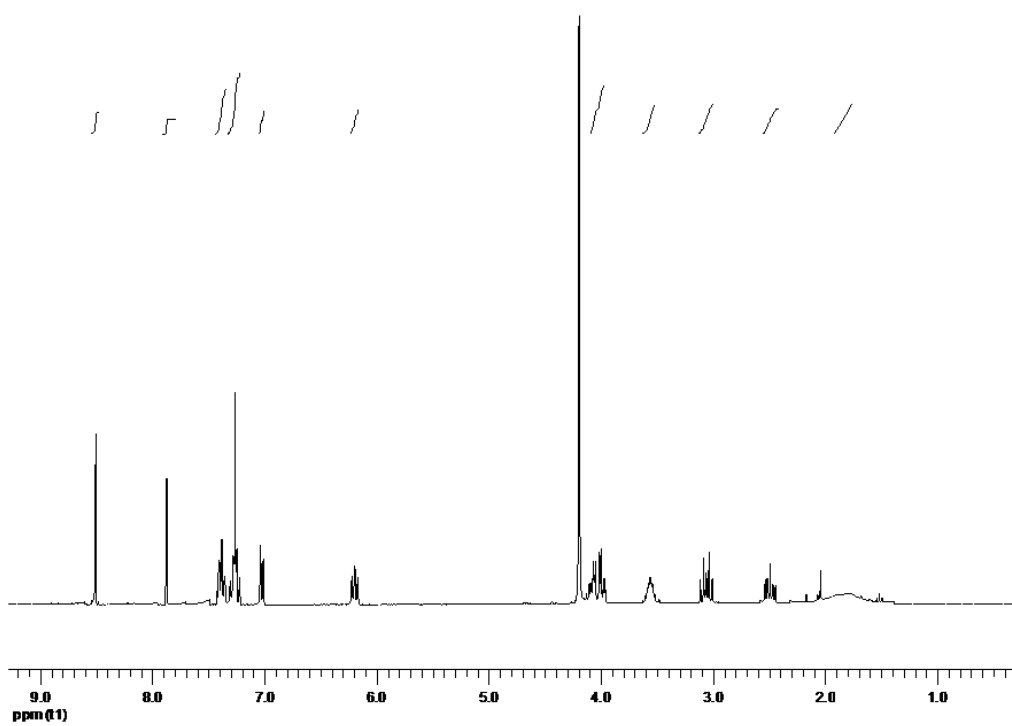
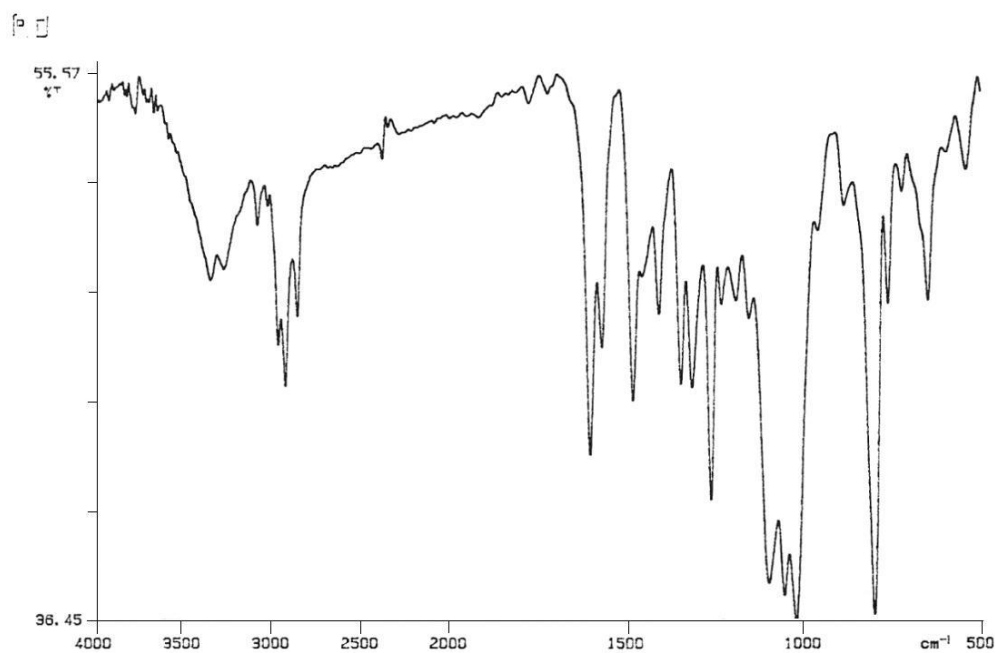
**Compuesto 71:** Sólido blanco, p.f. 184-188°C.

**IR (NaCl)  $\nu$**  = 3394, 1602, 1480, 1316, 1229, 1056, 760, 649  $\text{cm}^{-1}$ .

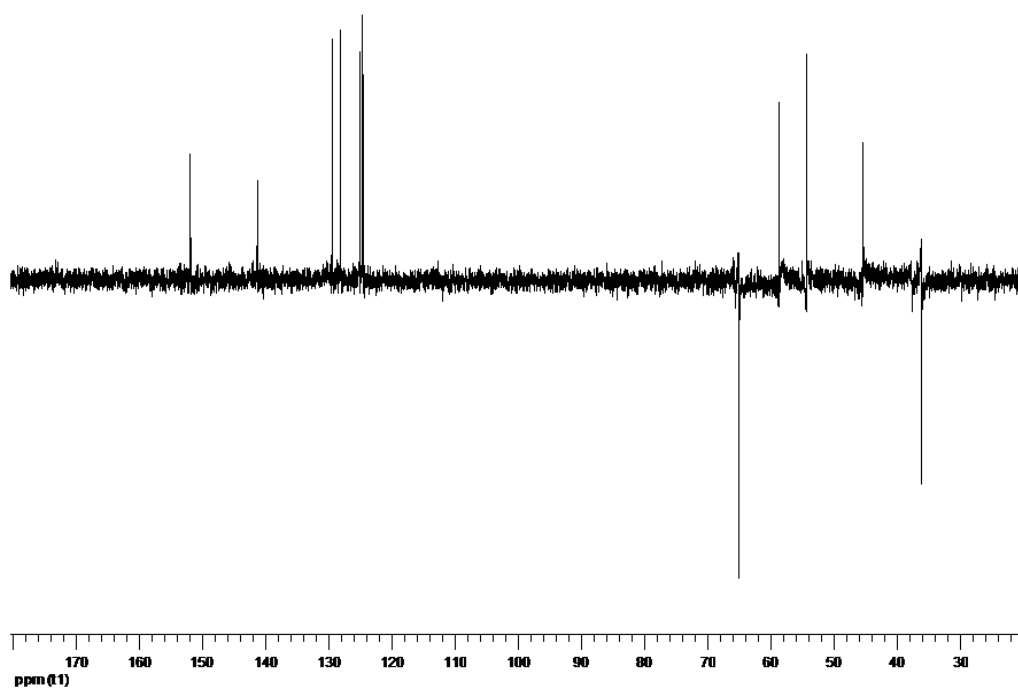
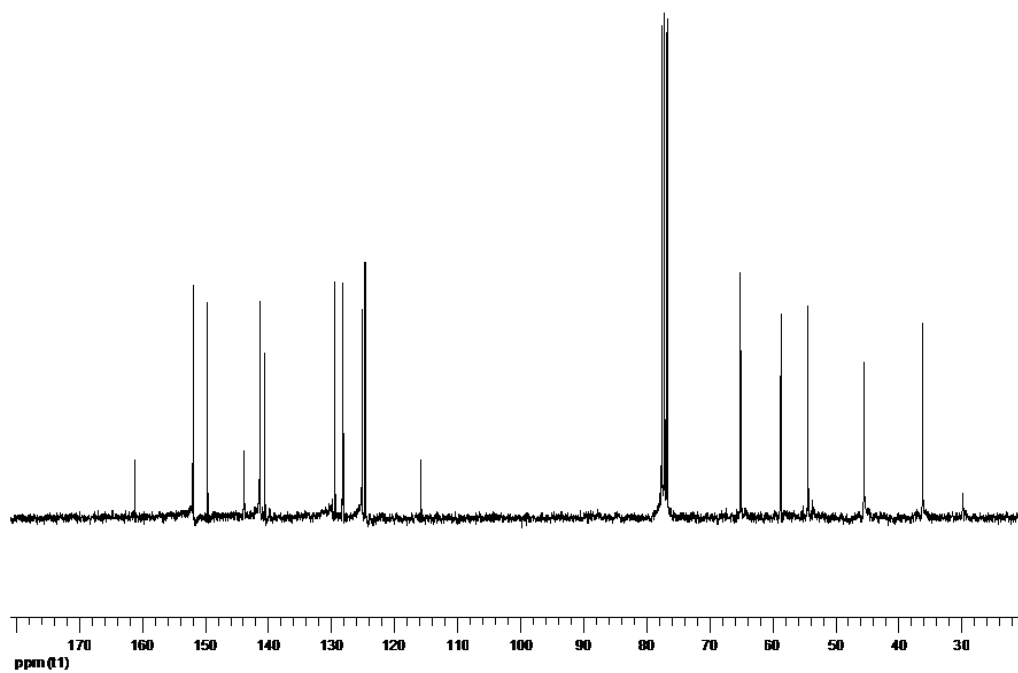
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 8.51 (s, 1H, 8'-H), 7.87 (s, 1H, 2'-H), 7.46-7.01 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.19 (t, 1H,  $J_{(t)} = 7.9$  Hz, 3 $\beta$ -H), 4.19 (d, 3H,  $J_{(d)} = 2.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4.09-3.96 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.73-3.62 (m, 1H, 1 $\beta$ -H), 3.05 (dt, 1H,  $J_{(t)} = 13.9$  Hz,  $J_{(d)} = 8.8$  Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.53-2.44 (m, 1H, 2 $\beta$ -H), 1.78 (s.an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , OH).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 161.12 (C), 151.86 (CH), 149.60 (C), 143.77 (C), 141.25 (CH), 140.48 (C), 129.34, 128.04, 124.97 y 124.55 (CH), 115.66 (C), 64.93 ( $\text{CH}_2$ ), 58.52 (CH), 54.22 ( $\text{CH}_3$ ), 45.32 (CH), 36.00 ( $\text{CH}_2$ ).

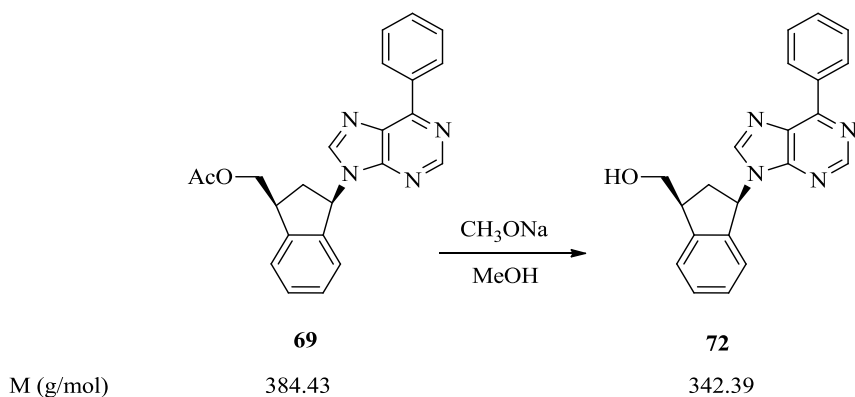
Análisis calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$  (296.32): C 64.85, H 5.44, N 18.91; encontrado C 64.53, H 5.91, N 19.03.







**4.17. (±)-cis-3-(6-Fenil-9H-purin-9-il)-1-indanilmetanol (72).**



Sobre una disolución de **69** (0.05 g; 0.13 mmol) en MeOH (5 mL), bajo atmósfera de argón, se añadió MeONa en polvo al 95% (0.02 g; 0.26 mmol) y se dejó en agitación durante 20 h. Transcurrido este tiempo se neutralizó la solución por adición de resina ácida Dowex 50 x 8 ( $\text{H}^+$ ) (ca. 100 mg) y se agitó la mezcla durante 20 min. A continuación se filtró la solución, lavándose la resina con MeOH saturado de amoníaco (10 mL) y MeOH (10 mL). Los filtrados obtenidos se reunieron y se concentraron a sequedad obteniéndose un sólido blanco que se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (6 g), eluyendo con Hexano/AcOEt (1:2), obteniéndose **72** bajo la forma de un sólido blanco. (0.03 g; Rdto. 68%).

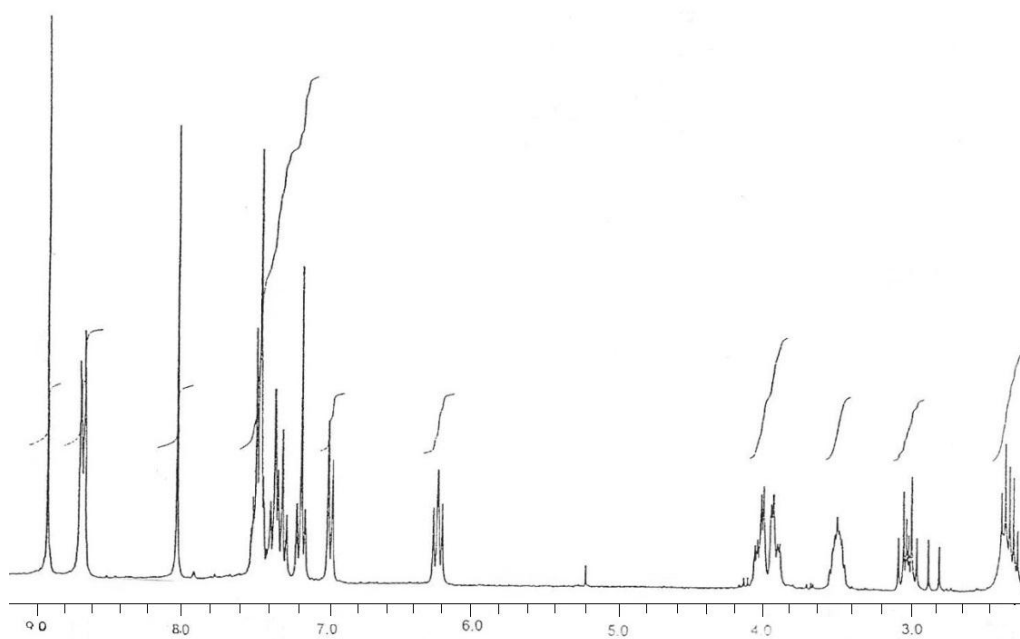
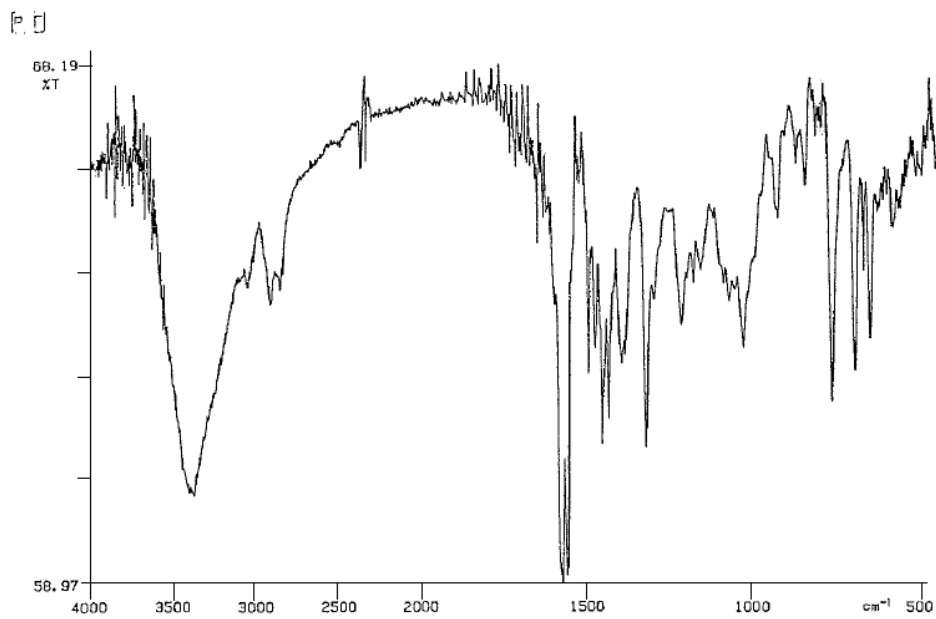
**Compuesto 72:** Sólido blanco, p.f. 53-56°C ( $\text{CHCl}_3$ /Hexano).

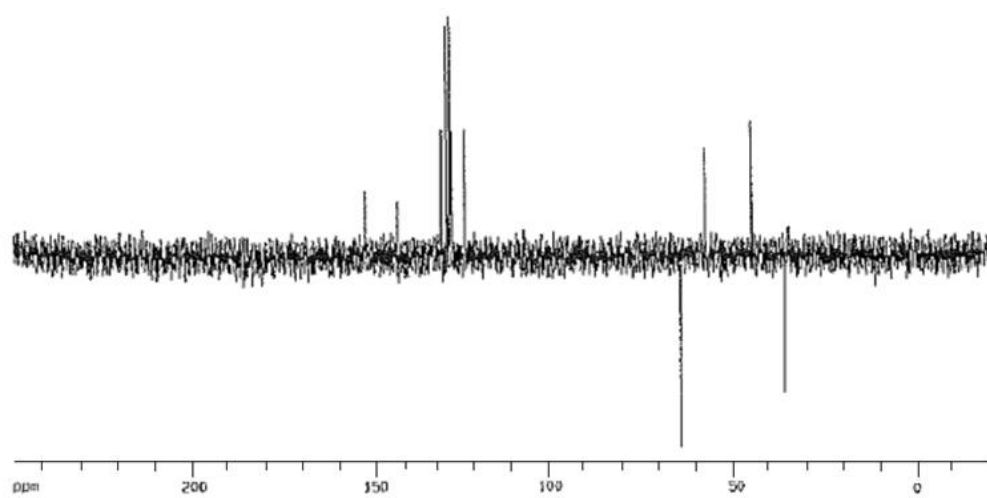
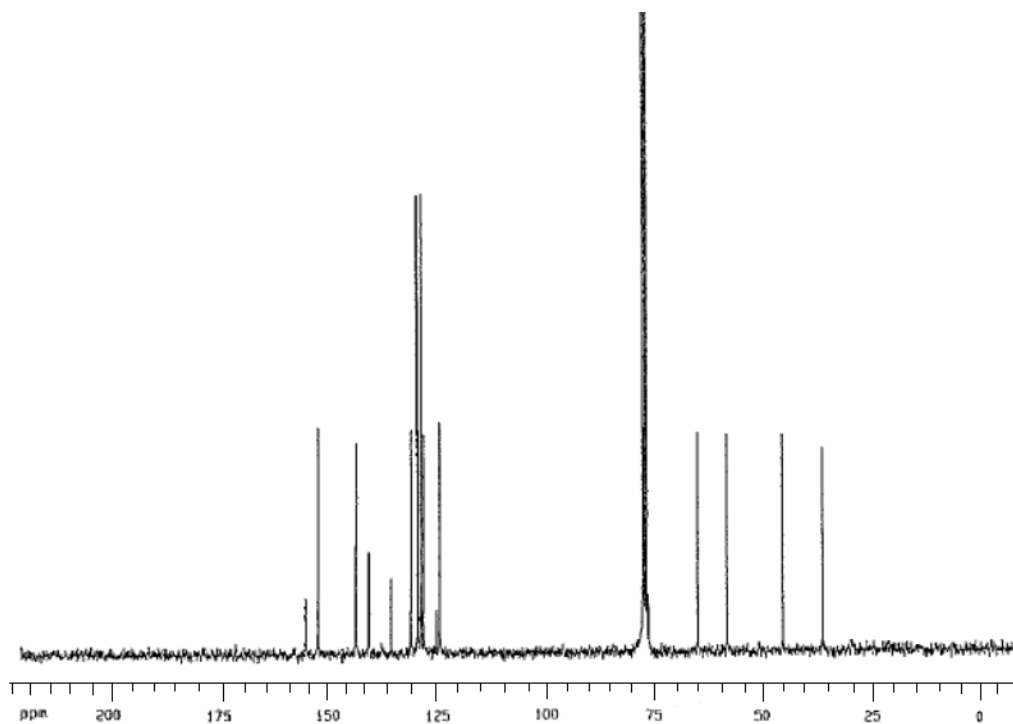
**IR (KBr)**  $\nu$  = 3378, 2921, 1654, 1562, 1499, 1416, 1350, 1325, 1265, 1131, 1030  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 8.93 (s, 1H, 2'-H), 8.69 (d, 2H,  $J$  = 7.7 Hz,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 8.03 (s, 1H, 8'-H), 7.53-7.08 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.99 (d, 1H,  $J$  = 7.6 Hz,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.23 (t, 1H,  $J$  = 7.6 Hz, 3 $\beta$ -H), 4.05-3.99 (Parte A de un sistema ABM, 1H,  $J_{AB}$  = 10.7 Hz,  $J_{AM}$  = 6.4 Hz, -CHHOH), 3.94-3.88 (Parte B de un sistema ABM, 1H,  $J_{BA}$  = 10.7 Hz,  $J_{BM}$  = 4.1 Hz, -CHHOH), 3.54-3.44 (m, 1H, 1 $\beta$ -H), 3.01 (dt, 1H,  $J_{(t)}$  = 13.8 Hz,  $J_{(d)}$  = 8.7 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.40-2.28 (dt, 1H,  $J_{(t)}$  = 13.8 Hz,  $J_{(d)}$  = 7.1 Hz, 2 $\beta$ -H).

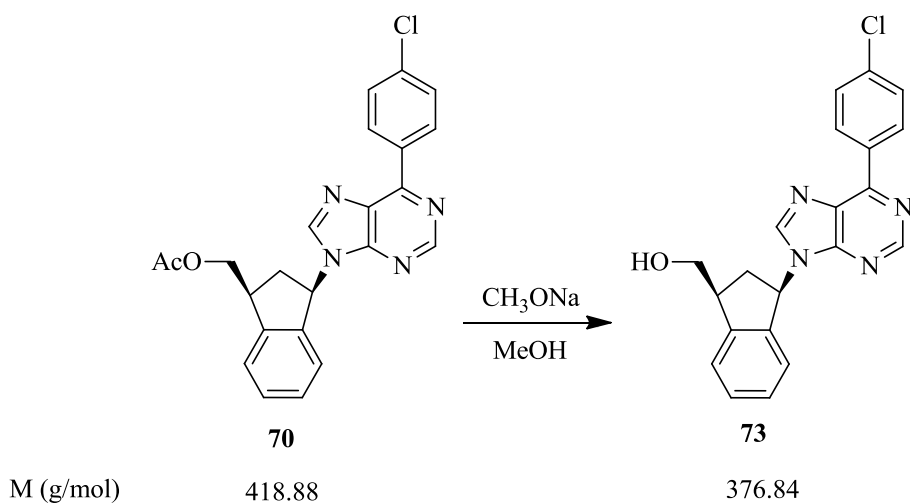
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 154.98 (C), 152.06 (CH), 143.68 (C), 143.36 (CH), 140.60 (C), 135.52 (C), 130.91 (C), 129.70, 129.32, 128.93, 128.58, 128.11 y 128.01 (CH), 124.48 (C), 124.36 (CH), 64.84 ( $\text{CH}_2$ ), 58.09 (CH), 45.16 (CH), 36.00 ( $\text{CH}_2$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}$  (342.39): C 73.67, H 5.30, N 16.36; encontrado C 73.49, H 5.39, N 16.62.





**4.18. (±)-cis-3-[6-(4'-Clorofenil)-9H-purin-9-il]-1-indanilmetanol (73).**



Siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado **4.17** se preparó el compuesto **73** a partir de **70**. (Rdto. 71%).

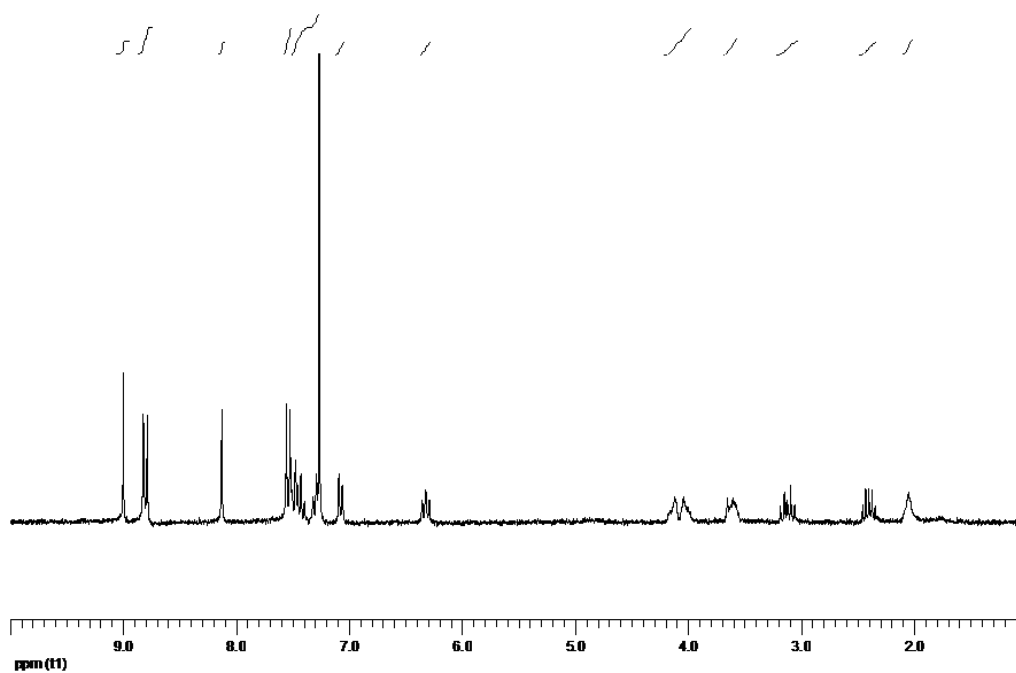
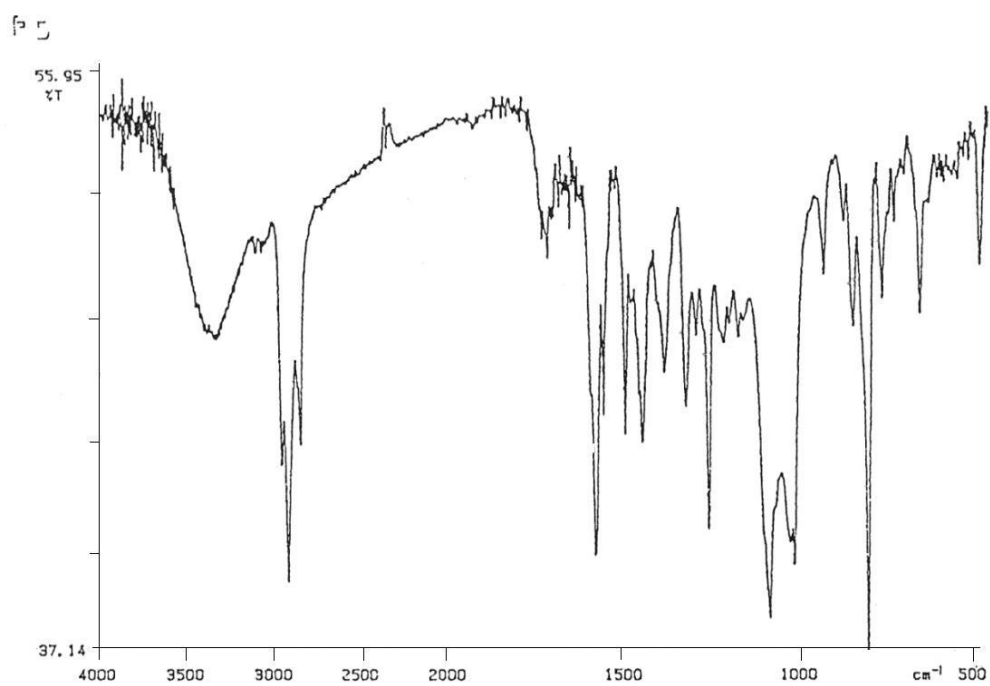
**Compuesto 73:** Sólido blanco, p.f. 56-59°C (CHCl<sub>3</sub>/Hexano).

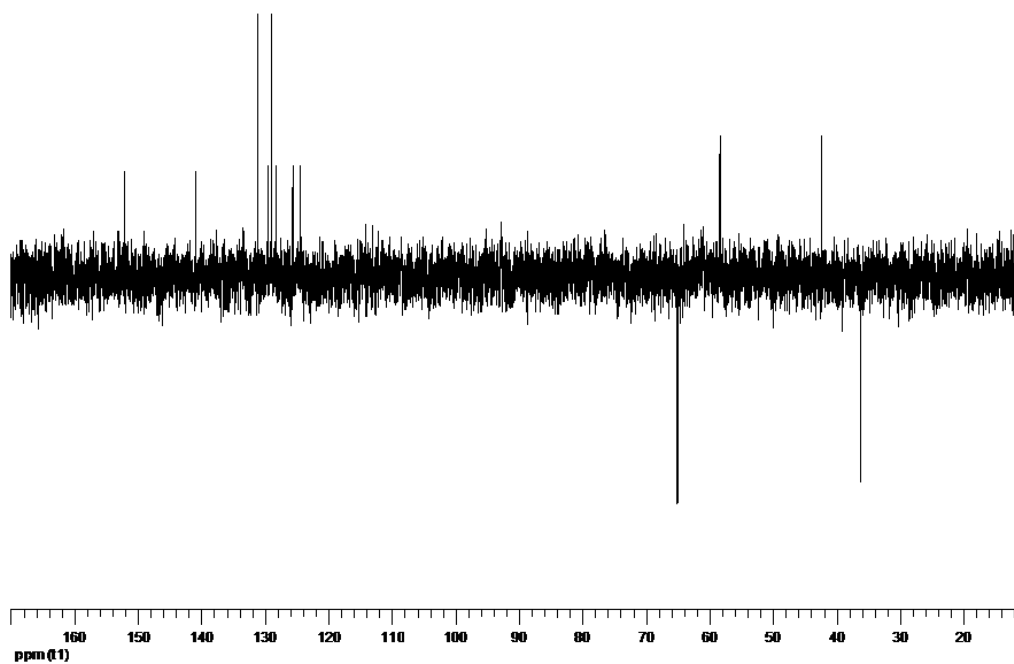
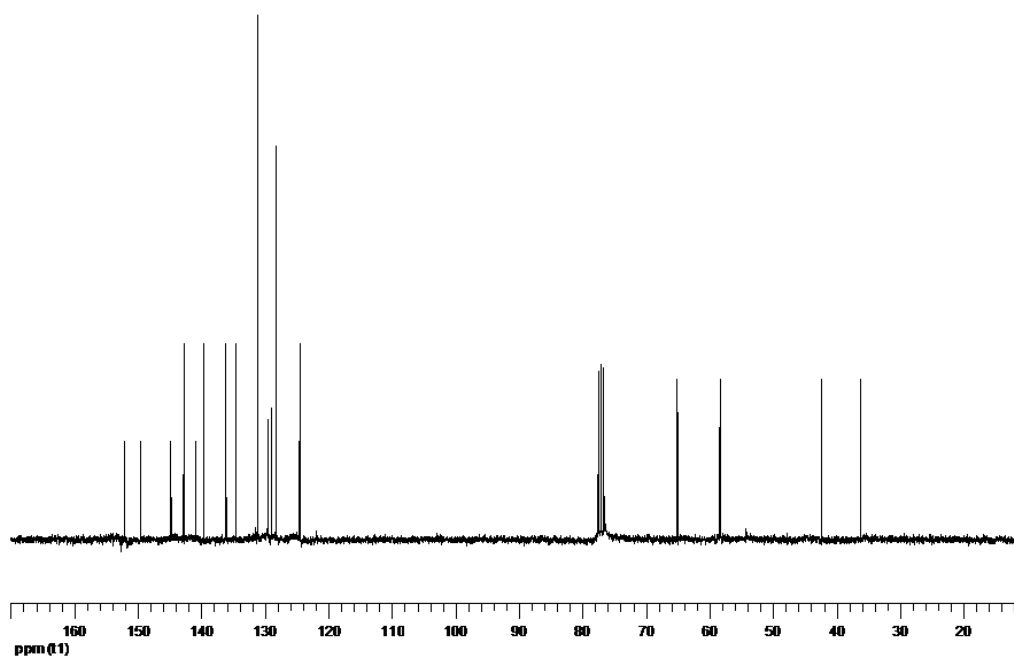
**IR (KBr)  $\nu$**  = 2922, 1582, 1518, 1497, 1485, 1447, 1416, 1386, 1344, 1261, 1240, 1086, 802, 757, 649 cm<sup>-1</sup>.

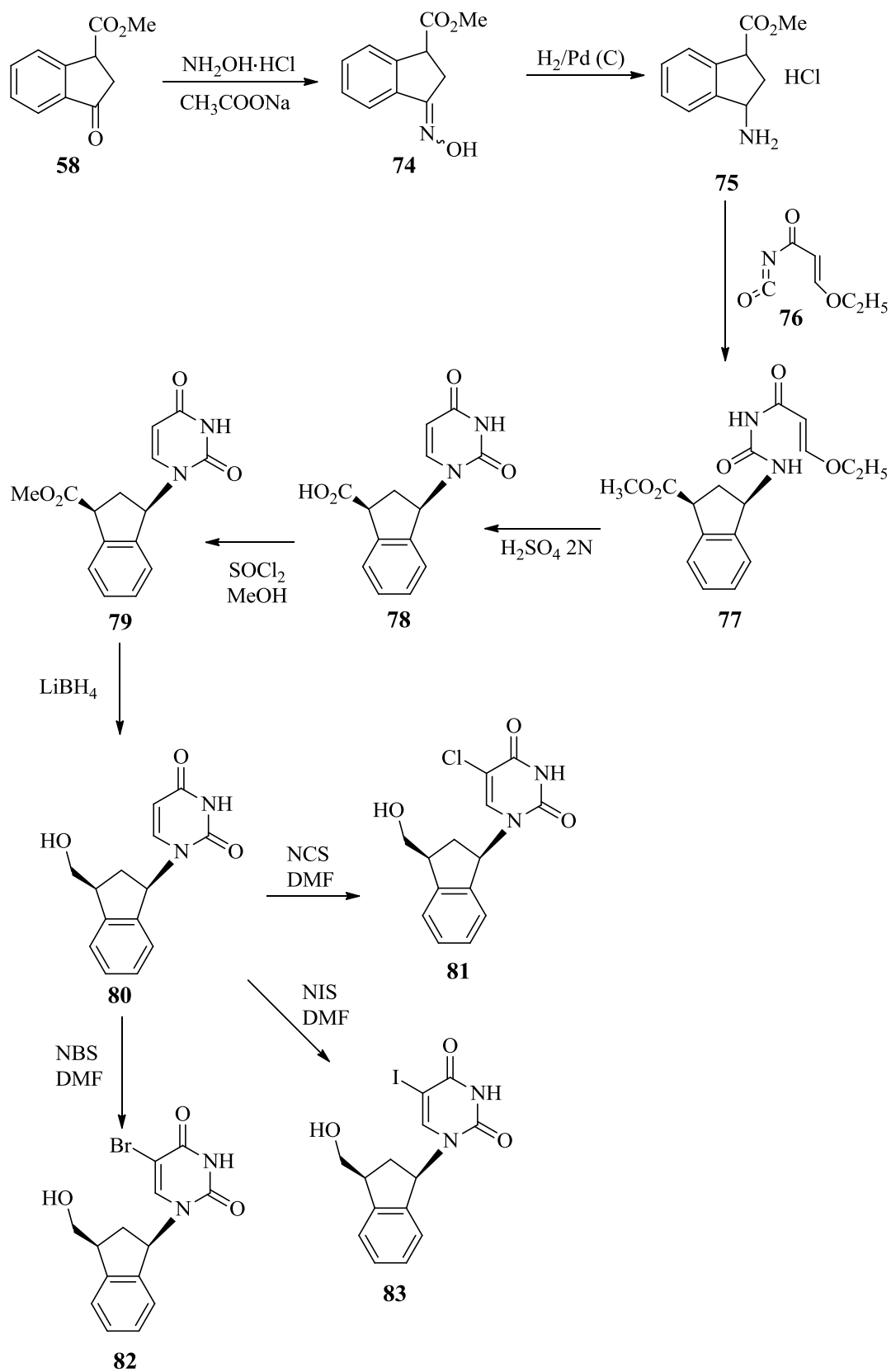
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$**  = 8.99 (s, 1H, 2'-H), 8.80 (d, 2H,  $J$  = 8.7 Hz, H<sub>arom</sub>), 8.12 (s, 1H, 8'-H), 7.52 (d, 2H,  $J$  = 8.7 Hz, H<sub>arom</sub>), 7.47-7.26 (m, 3H, H<sub>arom</sub>), 7.08-7.05 (d, 1H,  $J$  = 7.5 Hz, H<sub>arom</sub>), 6.35-6.28 (m, 1H, 3 $\beta$ -H), 4.15-3.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.64-3.59 (m, 1H, 1 $\beta$ -H), 3.11 (dt, 1H,  $J_{(t)}$  = 13.8 Hz,  $J_{(d)}$  = 7.7 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.39 (dt, 1H,  $J_{(t)}$  = 13.8 Hz,  $J_{(d)}$  = 7.1 Hz, 2 $\beta$ -H), 2.04 (s.an., 1H, OH intercambia con D<sub>2</sub>O).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$**  = 152.16 (CH), 149.53 (C), 144.78 (C), 142.77 (C), 140.88 (CH), 139.65 (C), 136.10 (C), 134.56 (C), 131.11, 129.51, 128.92, 128.18, 125.57 y 124.47 (CH), 64.96 (CH<sub>2</sub>), 58.25 (CH), 42.22 (CH), 36.08 (CH<sub>2</sub>).

Análisis calculado para C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>O (376.84): C 66.93, H 4.55, N 14.87; encontrado C 66.81, H 4.79, N 14.92.

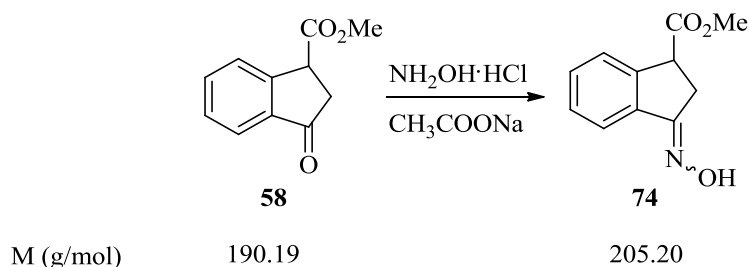








**4.19 *syn*- y *anti*-(3-Hidroxiimino)-1-indanocarboxilato de metilo (74).**



Una disolución de hidrocloreuro de hidroxilamina (2.25 g; 31.58 mmol) y acetato sódico (7.15 g; 52.50 mmol) en agua (20 mL) se adicionó sobre una disolución del cetoéster **58** (5.00 g; 26.28 mmol) en EtOH. Se puso a reflujo durante 1 hora. A continuación, se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 100 mL). Las fases orgánicas resultantes se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró por evaporación a vacío, obteniéndose la mezcla de oximas *syn*- y *anti*-**74**, como un sólido blanco (4.90 g; Rdto. 91%).

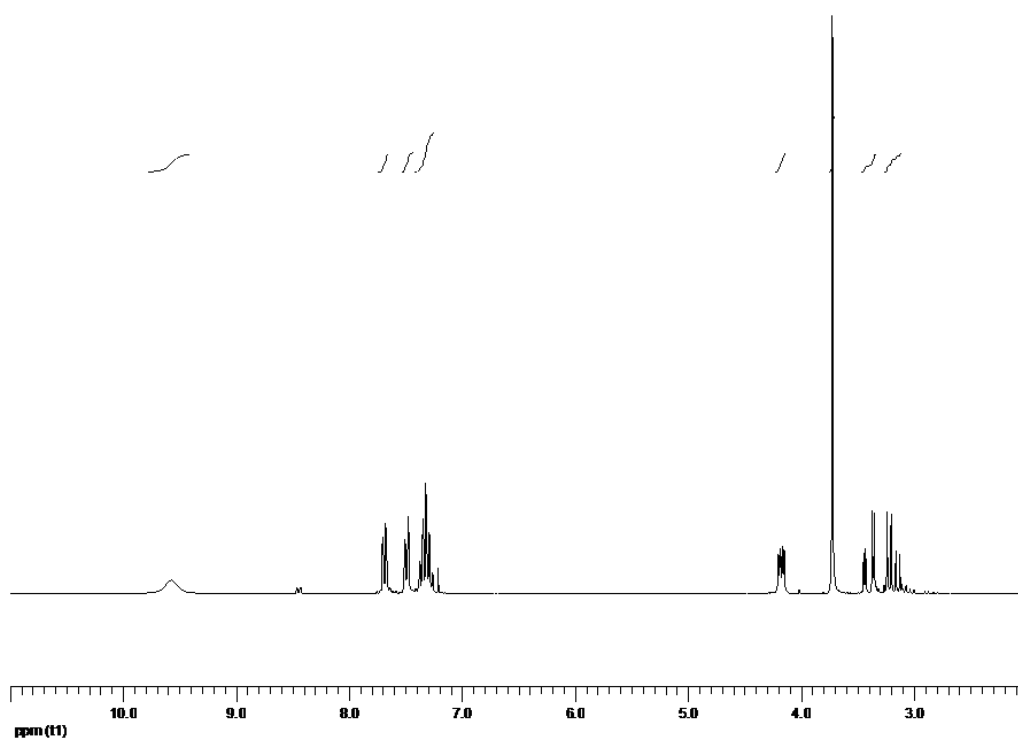
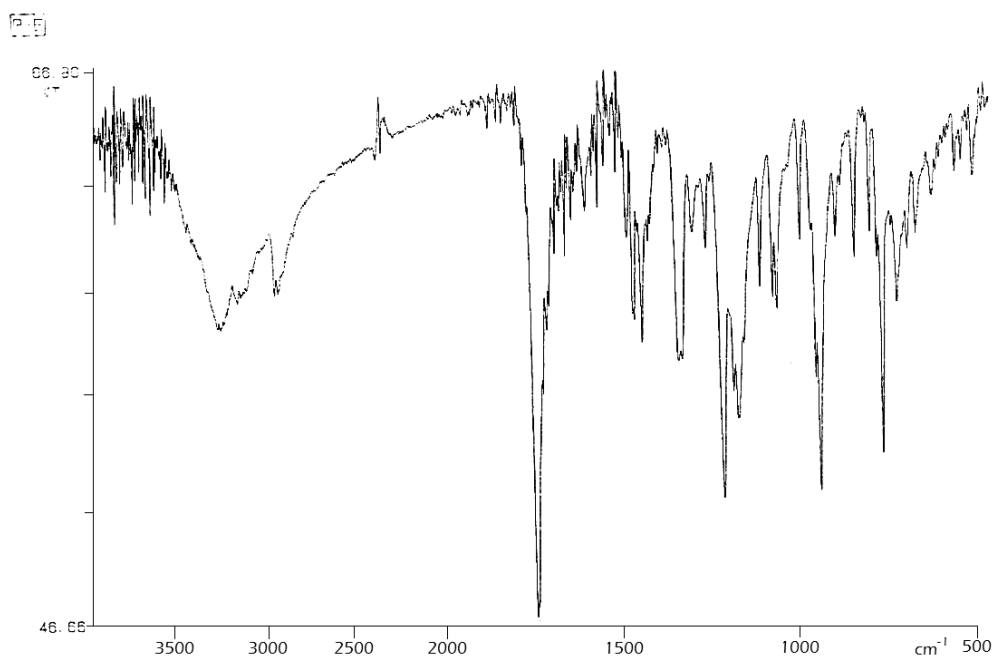
**Compuestos (±) 74:** Sólido blanco, p.f. 120-131°C.

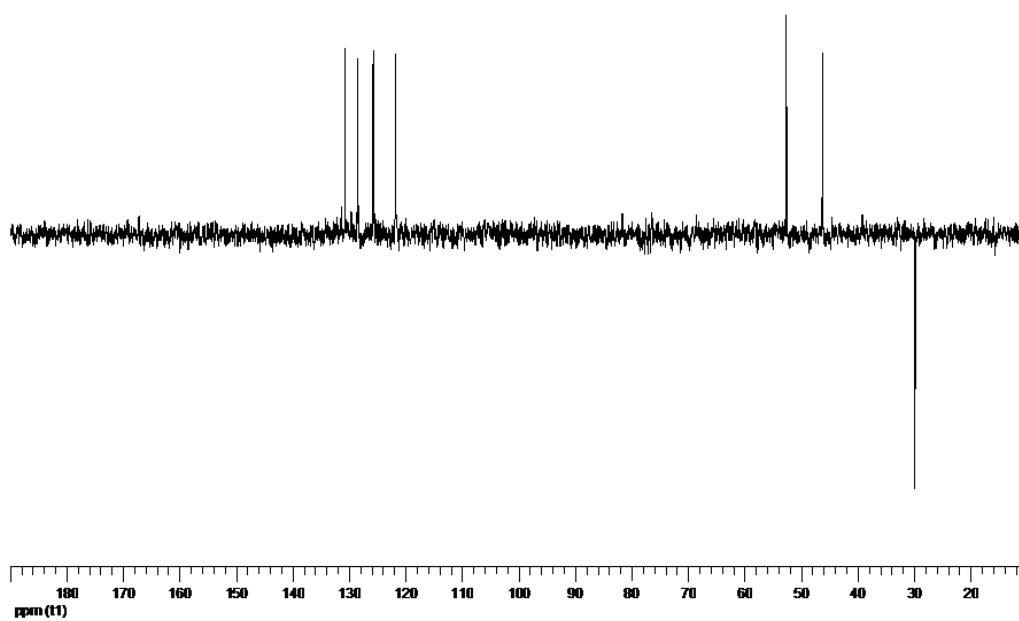
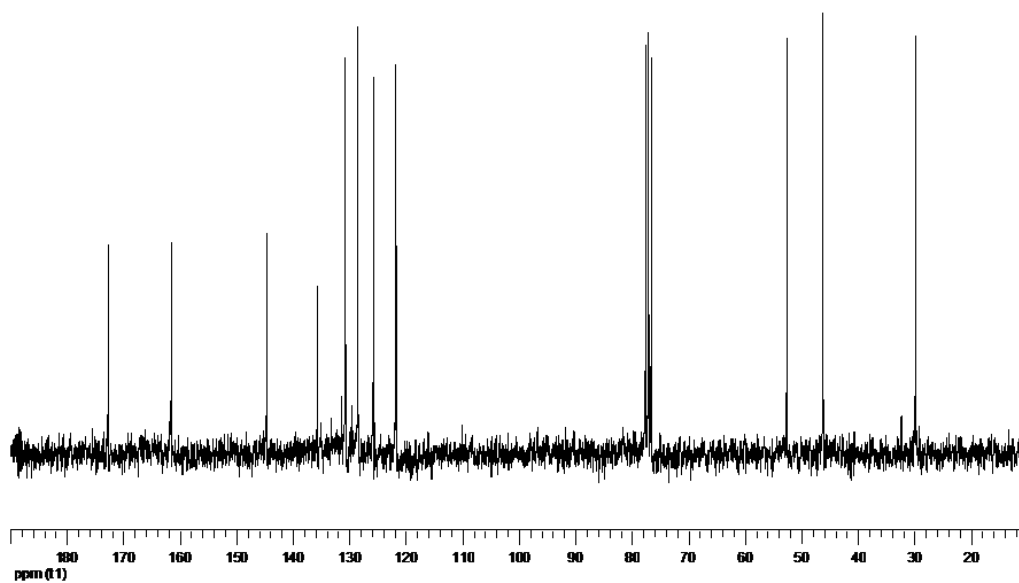
**IR (KBr)**  $\nu$  = 3259, 2934, 1739, 1596, 1462, 1325, 1208, 946, 934, 757 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 9.59 (s.an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, =N-OH), 7.69 (d, 1H,  $J$  = 7.6 Hz, 4-H), 7.54 (d, 1H,  $J$  = 7.6 Hz, 7-H), 7.42-7.32 (m, 2H, 5-H, 6-H), 4.24-4.20 (m, 1H, 1-H), 3.77 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.42 (dd, 1H,  $J_{gem}$  = 19.1 Hz,  $J_{vec}$  = 4.1 Hz, 2 $\alpha$ -H), 3.21 (dd,  $J_{gem}$  = 19.1 Hz,  $J_{vec}$  = 8.8 Hz, 2 $\beta$ -H).

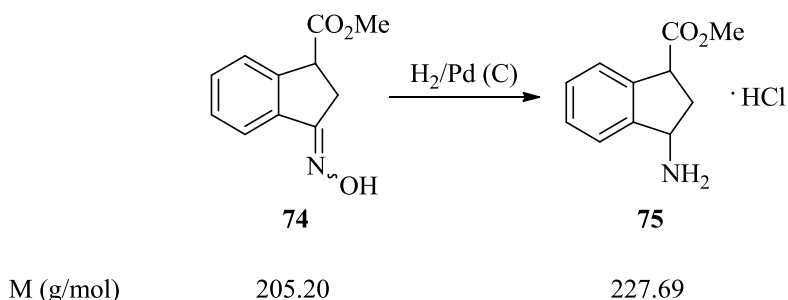
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 172.67 (C), 161.46 (C), 144.58 (C), 135.61 (C), 130.66, 128.46, 125.68 y 121.70 (CH), 52.43 (CH<sub>3</sub>), 46.08 (CH), 29.68 (CH<sub>2</sub>).

Análisis calculado para C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> (205.21): C 64.38, H 5.40, N 6.83; encontrado C 64.03, H 5.89, N 6.98.





**4.20. Clorhidrato de (±)-*cis*-3-amino-1-indanocarboxilato de metilo (75).**



Una solución de la mezcla de las oximas **74** (1.32 g; 6.43 mmol) en MeOH (50 mL) se puso en un reactor a presión sobre Pd/C 10 % (0.29 g), en presencia de  $\text{CHCl}_3$  (15 mL), a 60 bares y a una temperatura de 50°C durante 3 horas. A continuación se eliminó, por filtración, el catalizador y la mezcla resultante se concentró a presión reducida obteniéndose un sólido blanco (1.31 g; Rdto 90%) que fue identificado como el compuesto **75**.

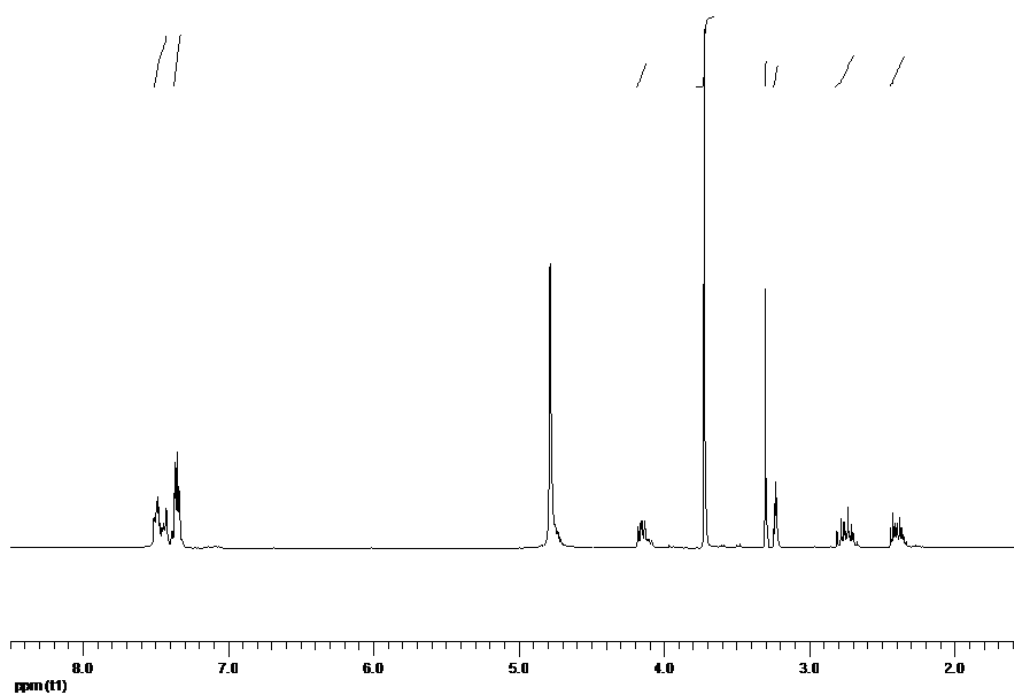
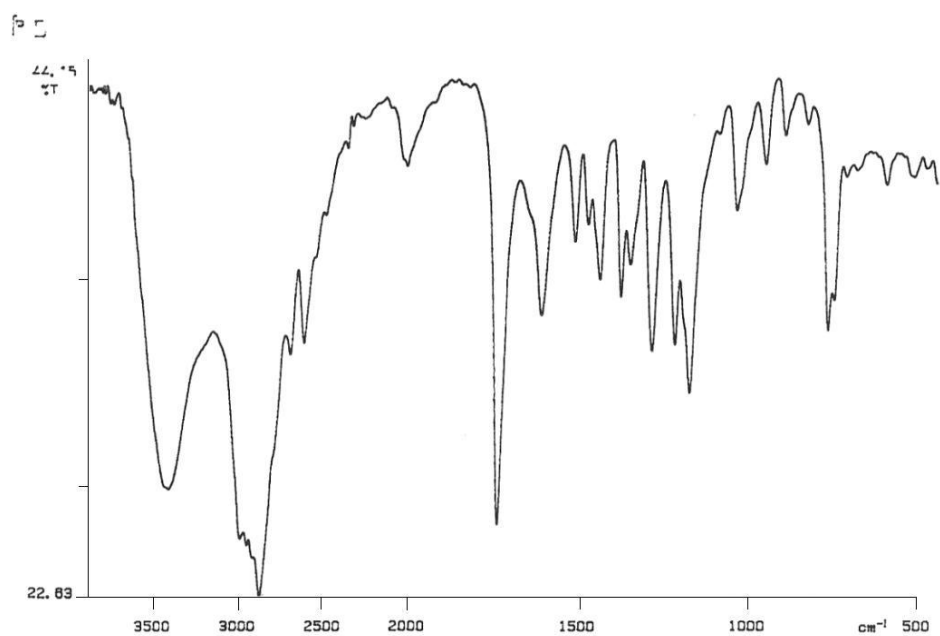
**Compuestos 75:** Sólido blanco, p.f. 196°C.

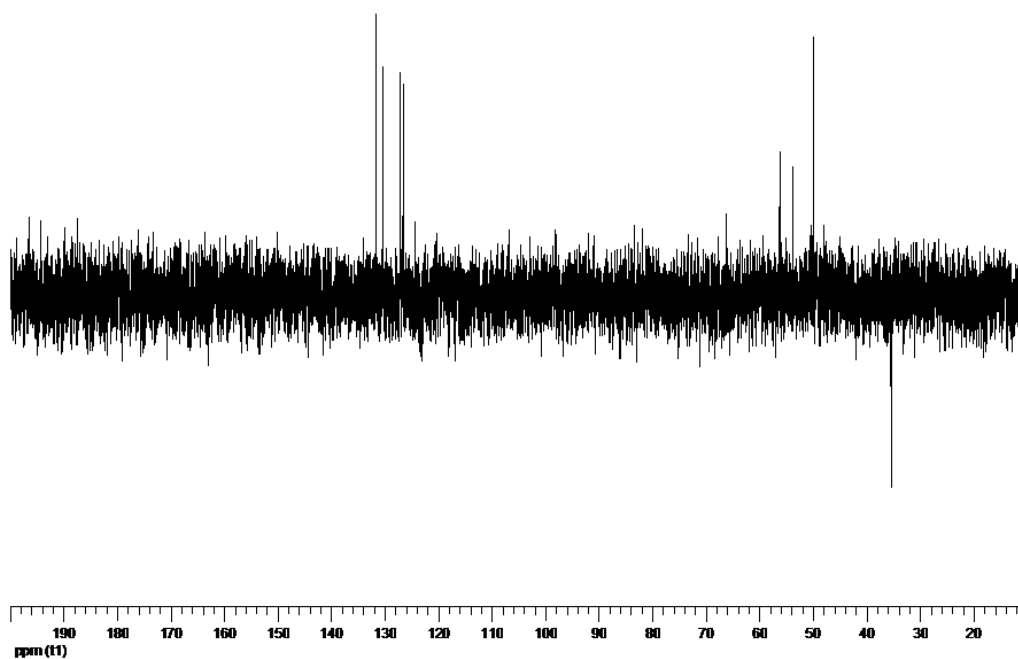
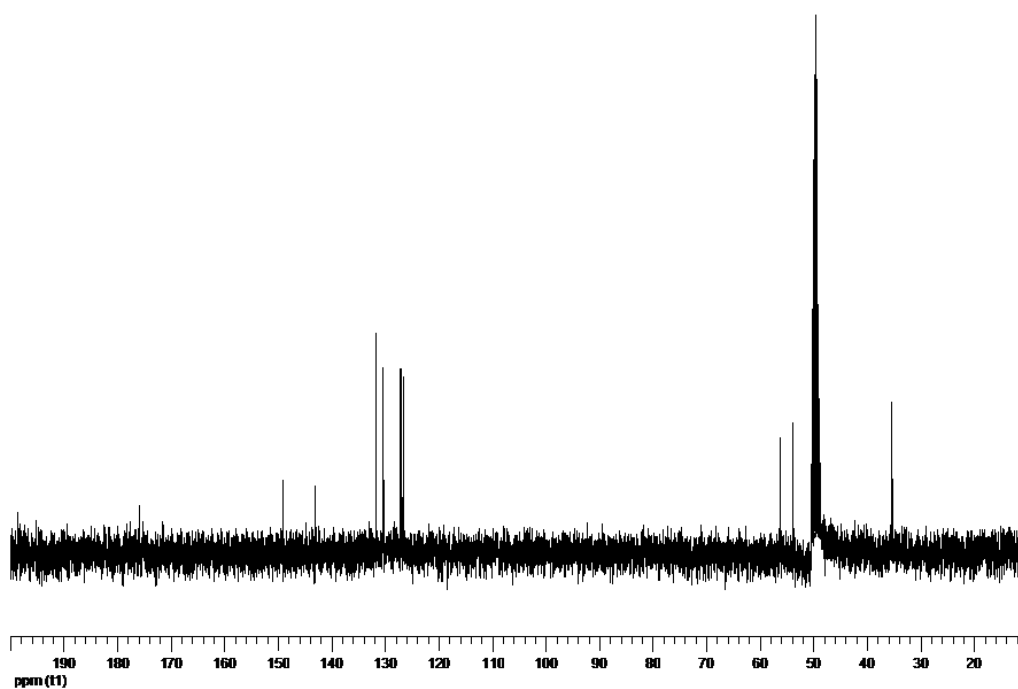
**IR (KBr)**  $\nu = 3419, 3164, 2625, 1740, 1441, 1206, 1176, 1039, 769 \text{ cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, MeOH- $d_4$ )**  $\delta = 7.60\text{-}7.41$  (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 4.23 (q, 1H,  $J = 5.1 \text{ Hz}$ , 1-H), 3.79 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.30 (s.an., 2H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_2$ ), 3.31 (m, 1H, 3H), 2.82 (dt,  $J_d = 14.2 \text{ Hz}$ ,  $J_t = 8.1 \text{ Hz}$ ,  $2\alpha\text{-H}$ ), 2.46 (dd,  $J_d = 14.2 \text{ Hz}$ ,  $J_t = 5.1 \text{ Hz}$ ,  $2\beta\text{-H}$ ).

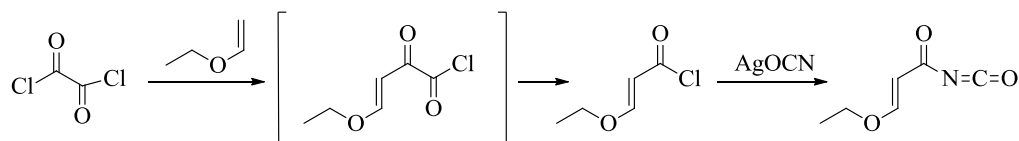
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, MeOH- $d_4$ )**  $\delta = 175.79$  (C), 149.12 (C), 142.95 (C), 131.64, 130.35, 127.02 y 126.50 (CH), 56.08 ( $\text{CH}_3$ ), 53.64 (CH), 49.79 (CH), 35.15 ( $\text{CH}_2$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2$  (227.69): C 58.03, H 6.20, N 6.15; encontrado C 58.24, H 6.12, N 6.21.





#### 4.21. Isocianato de 3-etoxiacriloilo (76).



M (g/mol) 126.93

134.56

141.12

Sobre el cloruro de oxalilo (12.90 mL; 150 mmol) se añadió, lentamente y a 0°C, etilviniléter (9.56 mL; 100 mmol). La reacción se agitó a 0°C durante 2 horas y a temperatura ambiente durante 12 horas. El exceso de cloruro de oxalilo se eliminó y el residuo obtenido se calentó a 120°C durante 30 minutos y luego se purificó por destilación a vacío proporcionando el cloruro de 3-etoxi-2-propenoilo (10.22 g; Rdto. 76%) como un aceite incoloro.

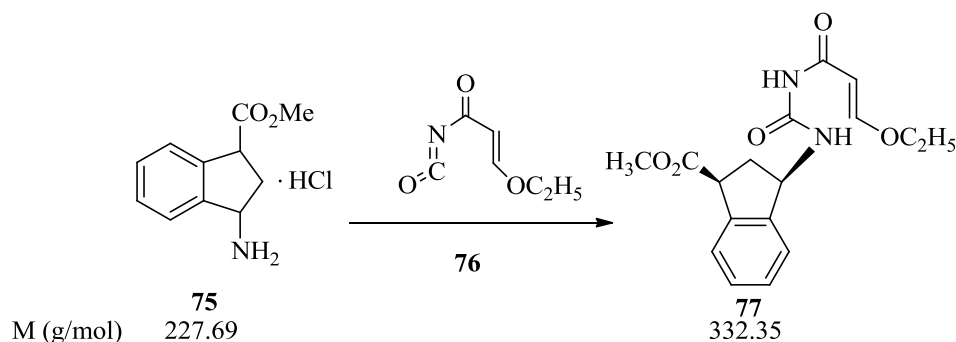
**Cloruro de 3-etoxi-2-propenoilo:** Aceite incoloro, p.eb. 90-95°C /30 mbar (Lit<sup>93</sup> p.eb. 60-61°C /5 mbar).

**IR (NaCl)  $\nu$  =** 2987, 1744, 1684, 1542, 1322, 1246, 1136 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  =** 7.74 (d, 1H,  $J_d$  = 12.1 Hz, 3-H), 5.45 (d, 1H,  $J_d$  = 12.1 Hz, 2-H), 4.03 (q, 2H,  $J$  = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.35 (t, 3H,  $J_t$  = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

Se reflujo cianato de plata (16.27 mL; 108 mmol; previamente secado sobre pentóxido de fósforo a 100°C durante 3 horas) con benceno seco (80 mL) durante 30 min. A continuación se añadió, gota a gota, una solución de cloruro de 3-etoxi-2-propenoilo (7.30 g; 54 mmol) en benceno seco (20 mL). La solución resultante se agitó a reflujo durante 30 minutos. La mezcla obtenida se dejó reposar y el sobrenadante (disolución de isocianato de 3-etoxiacriloilo, **76**, en benceno) se decantó y se utilizó directamente en la siguiente reacción.

**4.22. (±)-*cis*-N-(3-Metoxycarbonil-1-indanil)-N'-(3-etoxipropenoil)urea (77).**



Sobre una disolución de **75** (83 mg; 3.65 mmol) en DMF anhidra (20 mL), bajo atmósfera de argón y protegida de la luz, se añadió DMAP (1.79 g; 14.53 mmol) y trietilamina (2 mL; 14.58 mmol). Tras 30 minutos y previo enfriamiento a  $-25^{\circ}\text{C}$ , se añadió una disolución de isocianato de 3-etoxiacriloilo, **76** (9.47 mL; 0.25 mmol; concentración 0.96 M) a una velocidad adecuada para que la temperatura no supere los  $-25^{\circ}\text{C}$ . Finalizada la adición, se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 12 horas. A continuación, se concentró la mezcla a presión reducida y a una temperatura inferior a  $40^{\circ}\text{C}$ , eliminando el exceso de disolvente por repetidas coevaporaciones con etanol-tolueno, obteniéndose un sólido marrón que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (168 g), usando como fase móvil Hexano/AcOEt (2:1), aislándose el compuesto **77**, como un sólido blanco (94 mg; Rdto. 78%).

**Compuestos 77:** Sólido blanco, p.f.  $183\text{--}185^{\circ}\text{C}$ .

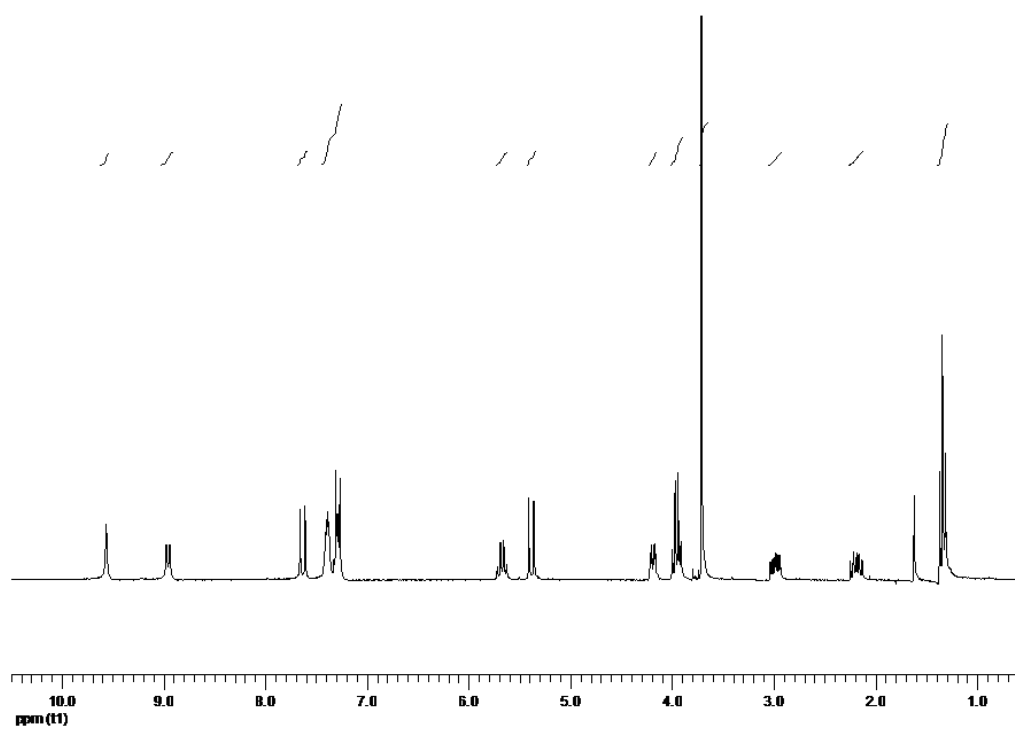
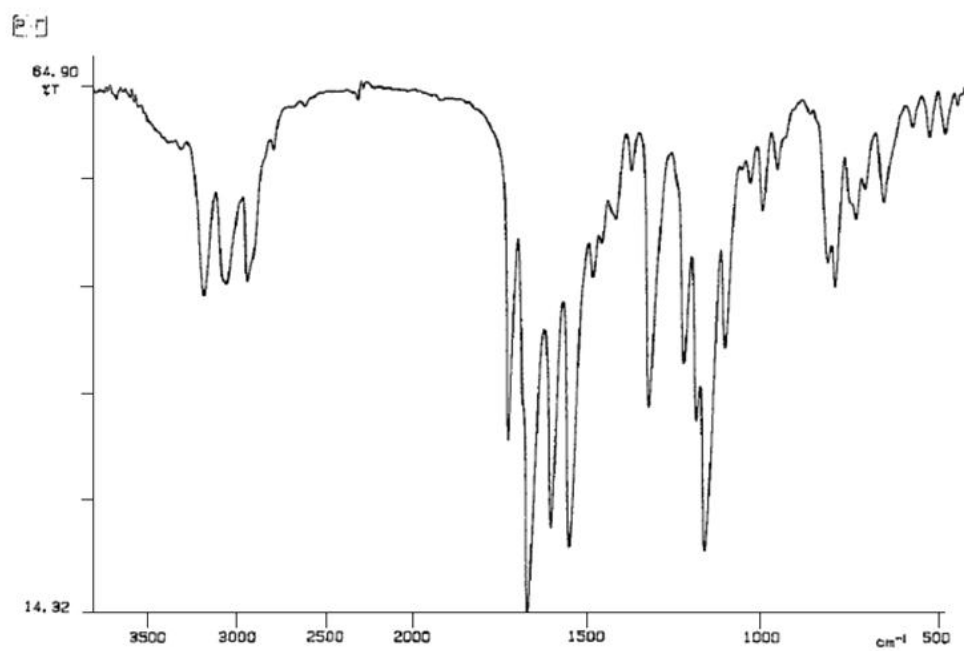
**IR (KBr)**  $\nu = 3229, 3102, 2983, 1736, 1673, 1557, 1337, 1238, 1191, 1122, 807\text{ cm}^{-1}$ .

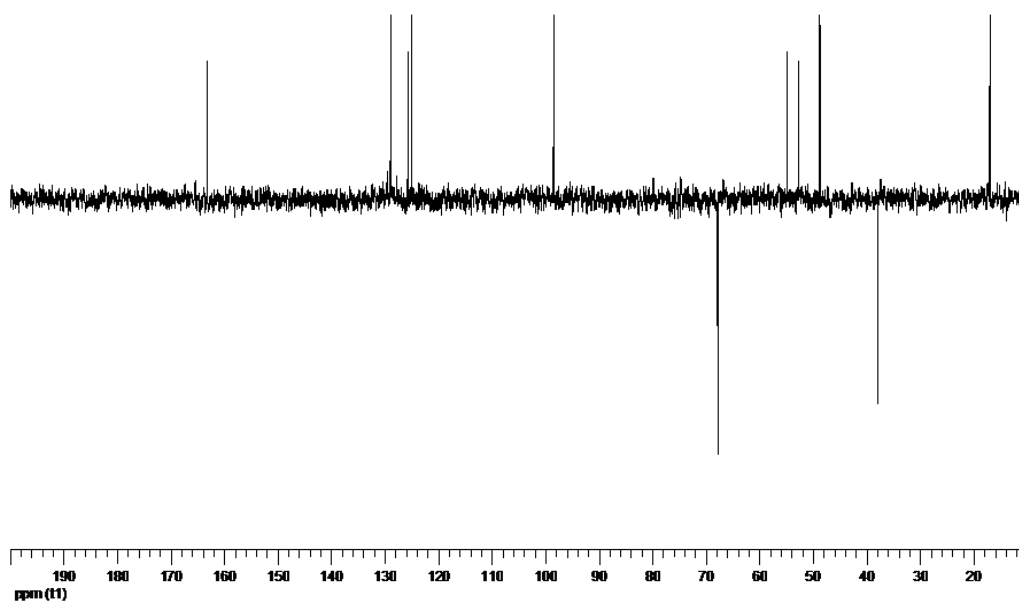
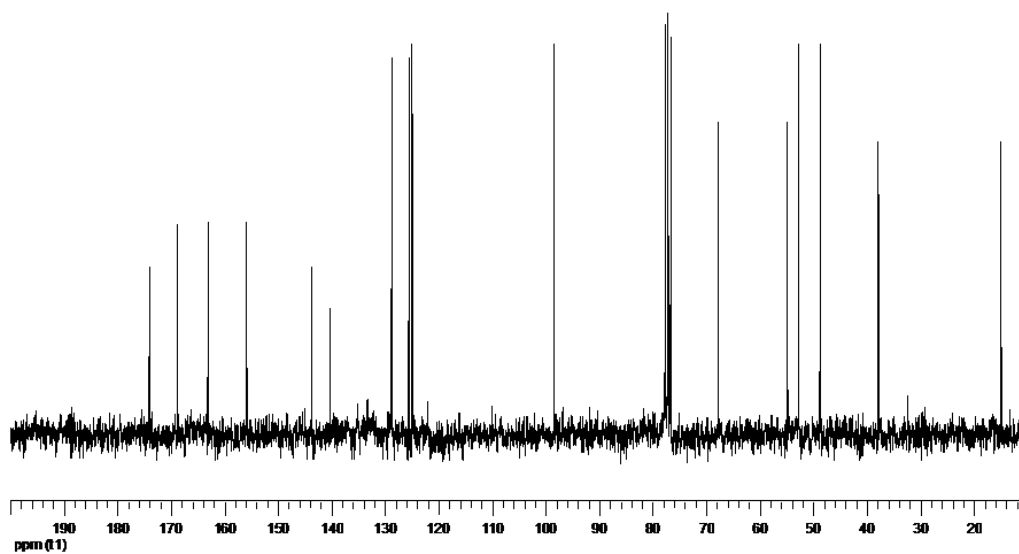
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 9.56$  (s.an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{NHCONHCO}$ ), 8.95 (d, 1H,  $J_d = 8.0\text{ Hz}$ , intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{NHCONHCO}$ ), 7.63 (d, 1H,  $J_d = 12.3\text{ Hz}$ ,  $\text{CHOEt}$ ), 7.40-7.26 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.70-5.60 (m, 1H,  $3'\beta\text{-H}$ ), 5.38 (d, 1H,  $J_d = 12.3\text{ Hz}$ ,  $\text{COCH}$ ), 4.18 (d, 1H,  $J_d = 8.4\text{ Hz}$ ,  $1'\beta\text{-H}$ ), 3.95 (q, 2H,  $J_d = 7.0\text{ Hz}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.70 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.8 (dt, 1H,  $J_d = 13.7\text{ Hz}$ ,  $J_t = 7.0\text{ Hz}$ ,  $2'\alpha\text{-H}$ ), 2.34 (dt, 1H,  $J_d = 13.7\text{ Hz}$ ,  $J_t = 5.7\text{ Hz}$ ,  $2'\beta\text{-H}$ ), 1.33 (t, 3H,  $J_t = 7.0\text{ Hz}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 174.04$  (C), 168.81 (C), 163.04 (CH), 155.84 (C), 143.66 (C), 140.23 (C), 128.83, 128.71, 125.49 y 124.90 (CH), 98.35 (CH), 67.65 ( $\text{CH}_2$ ), 54.71 ( $\text{CH}_3$ ), 52.58 (CH), 48.57 (CH), 37.71 ( $\text{CH}_2$ ), 14.76 ( $\text{CH}_3$ ).

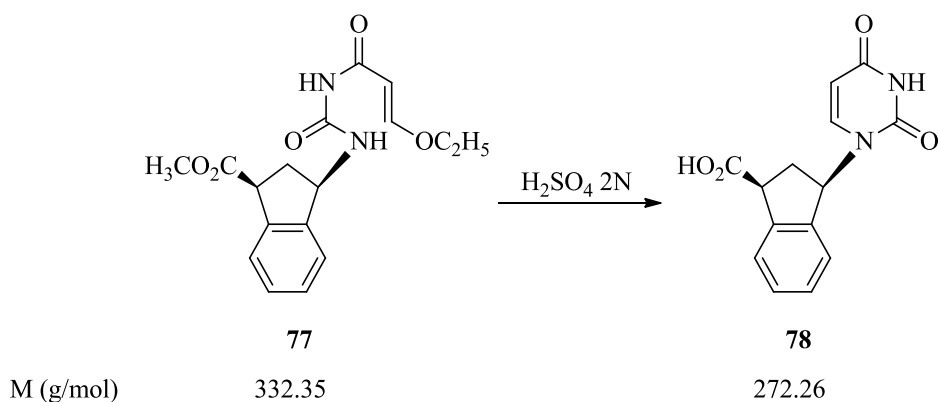
Análisis calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$  (332.35): C 61.44, H 6.07, N 8.43; encontrado C 61.12, H 6.31, N 8.61.







**4.23. (±)-*cis*-1-(3-Hidroxicarbonil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (78).**



Sobre una disolución de **77** (94 mg; 2.82 mmol) en dioxano (30 mL), se añadió  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N (35 mL) y se puso a refluxo durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, previo enfriamiento, la mezcla de reacción se neutralizó por adición de NaOH 2N hasta pH=7. A continuación, se eliminó el exceso de disolvente por rotación a sequedad con ayuda de etanol/tolueno, obteniéndose un residuo que fue sometido a cromatografía en columna sobre de gel de sílice (67 g), usando como fase móvil DCM/MeOH (25:1). De esta manera se obtuvo el compuesto **78** como un sólido blanco (76 mg; 99%).

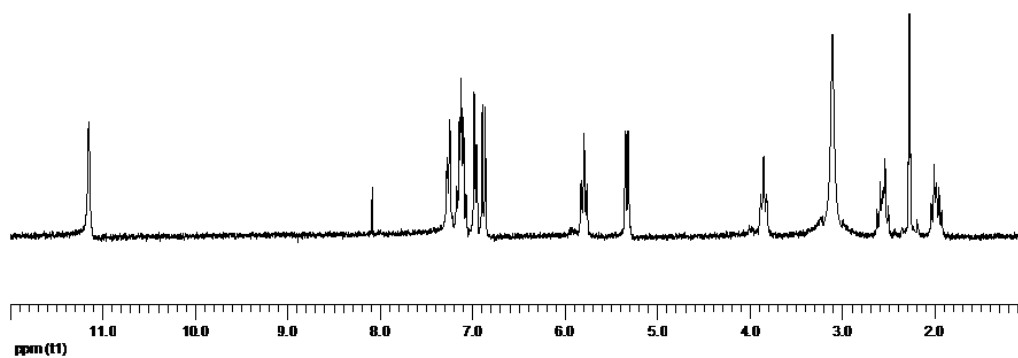
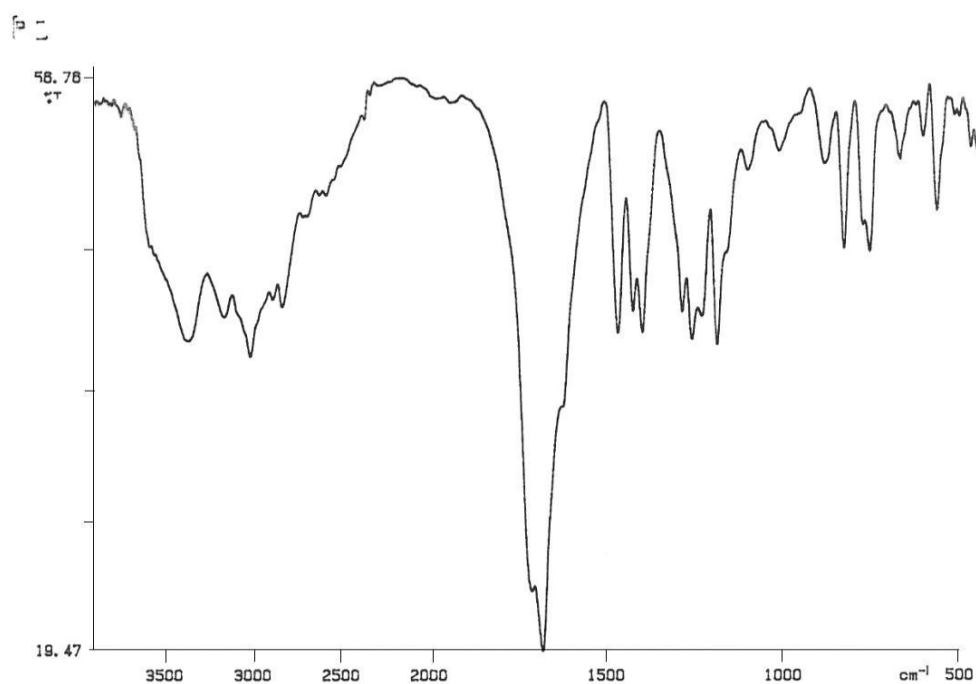
**Compuestos 78:** Sólido blanco, p.f. 192-195°C.

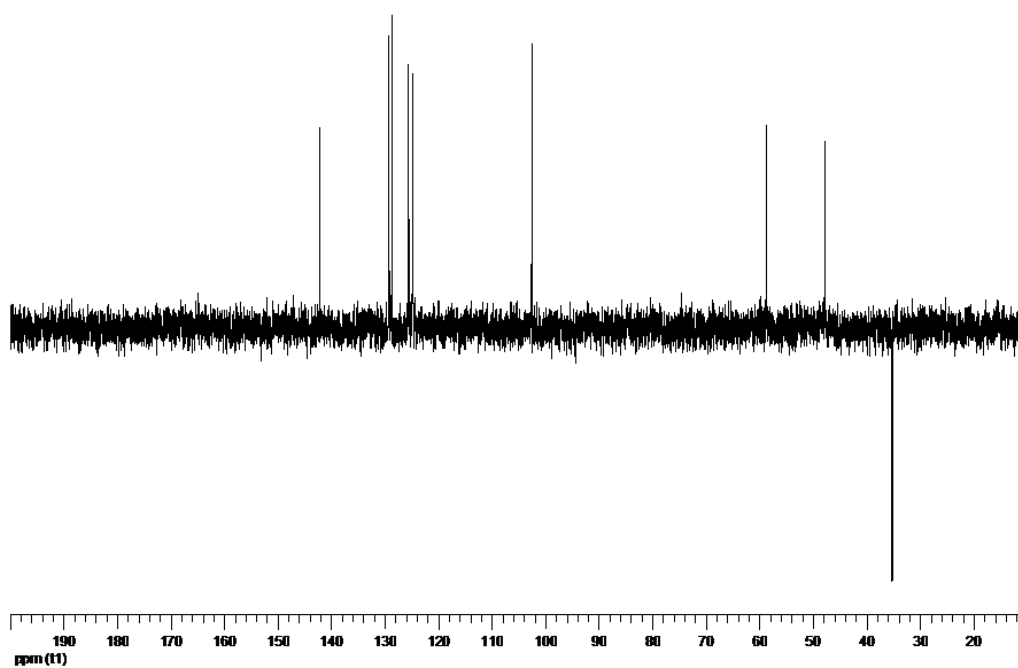
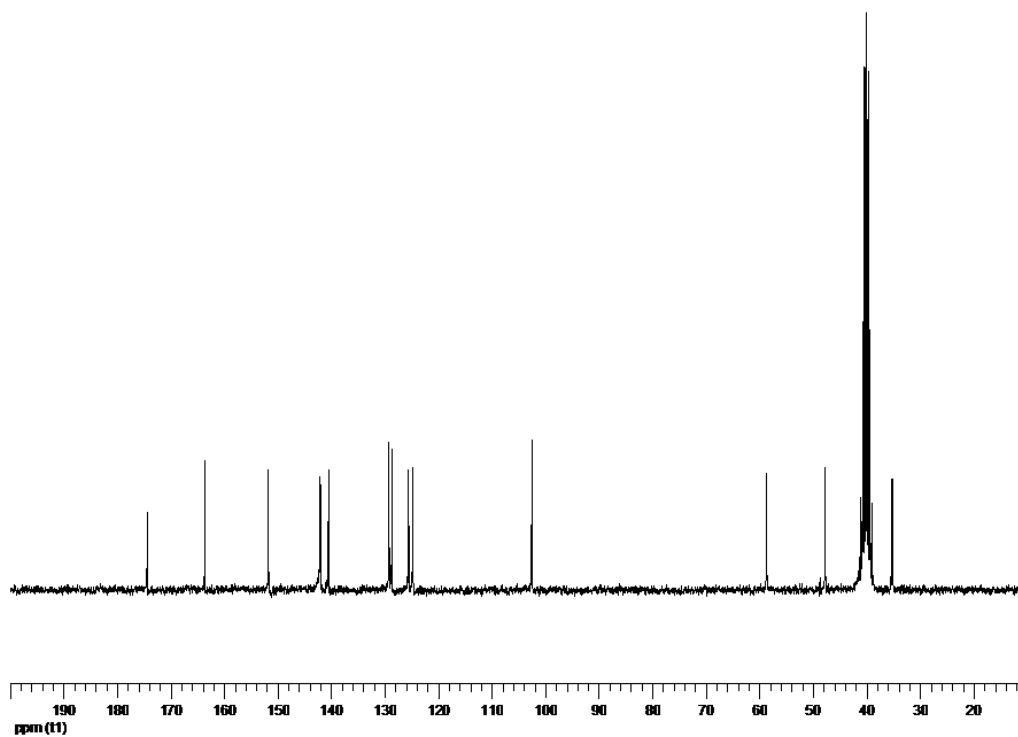
**IR (KBr)**  $\nu$  = 3374, 3263, 3021, 1682, 1469, 1445, 1287, 1188, 756, 566  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta$  = 11.14 (s.an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , COOH), 7.25 (d, 1H,  $J_d$  = 6.6 Hz, 6-H), 7.13-7.09 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.96 (d, 1H,  $J_d$  = 8.0 Hz,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.87 (d, 1H,  $J_d$  = 8.0 Hz,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.78 (t, 1H,  $J_t$  = 7.9 Hz, 1'β-H), 5.32 (d, 1H,  $J_d$  = 6.6 Hz, 5-H), 3.84 (t, 1H,  $J_t$  = 7.9 Hz, 3'β-H), 2.55 (dt, 1H,  $J_d$  = 13.3 Hz,  $J_t$  = 8.8 Hz, 2'α-H), 1.97 (dt, 1H,  $J_d$  = 13.3 Hz,  $J_t$  = 7.7 Hz, 2'β-H).

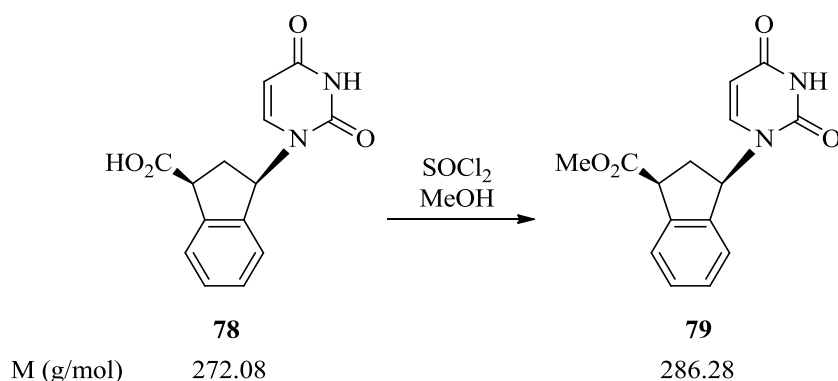
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta$  = 174.35 (C), 163.59 (C), 151.68 (C), 142.09 (CH), 141.87 (C), 140.45 (C), 129.13, 128.57, 125.45 y 124.68 (CH), 102.41 (CH), 58.50 (CH), 47.56 (CH), 35.01 ( $\text{CH}_2$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$  (272.26): C 61.76, H 4.44, N 10.29; encontrado C 61.41, H 4.63, N 10.31.





**4.24. (±)-cis-1-(3-Metoxycarbonil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (79).**



Sobre una disolución del derivado pirimidínico **78** (76 mg; 0.28 mmol) en MeOH (15 mL) se añadió, gota a gota y a 0°C, cloruro de tionilo (0.10 mL; 1.40 mmol). Se dejó agitando a temperatura ambiente durante 4 horas. Se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío y el sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (53 g), usando como fase móvil Hexano/AcOEt (1.5:1), obteniéndose **79** como un sólido blanco (74 mg; Rdto. 93%).

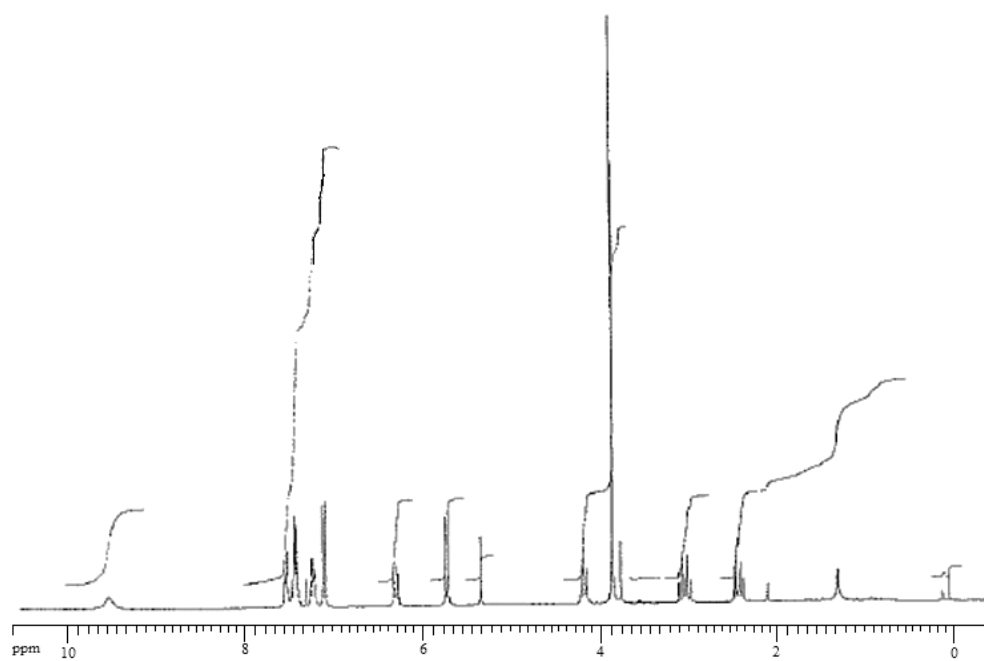
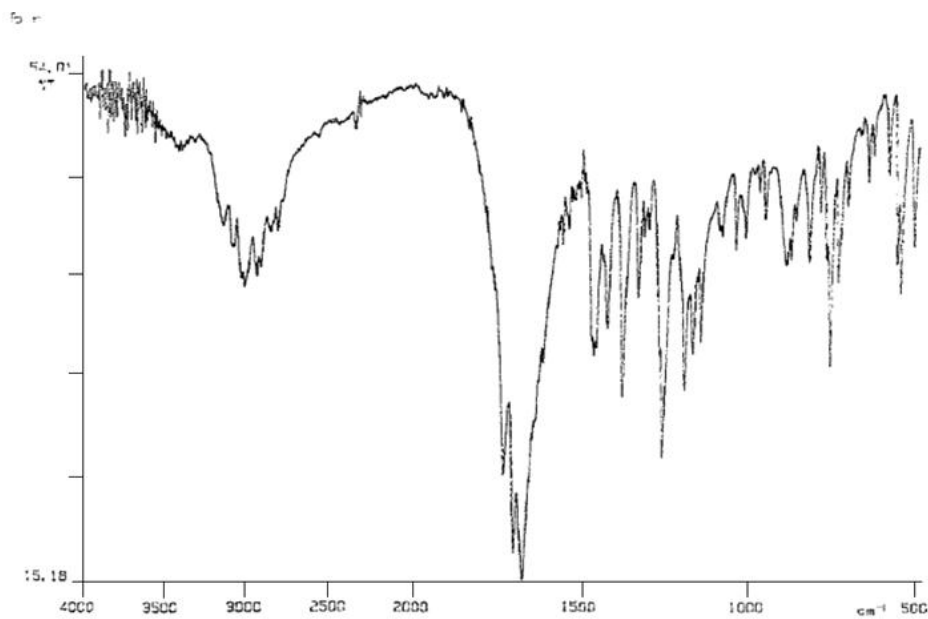
**Compuestos 79:** Sólido blanco, p.f. 160-162°C.

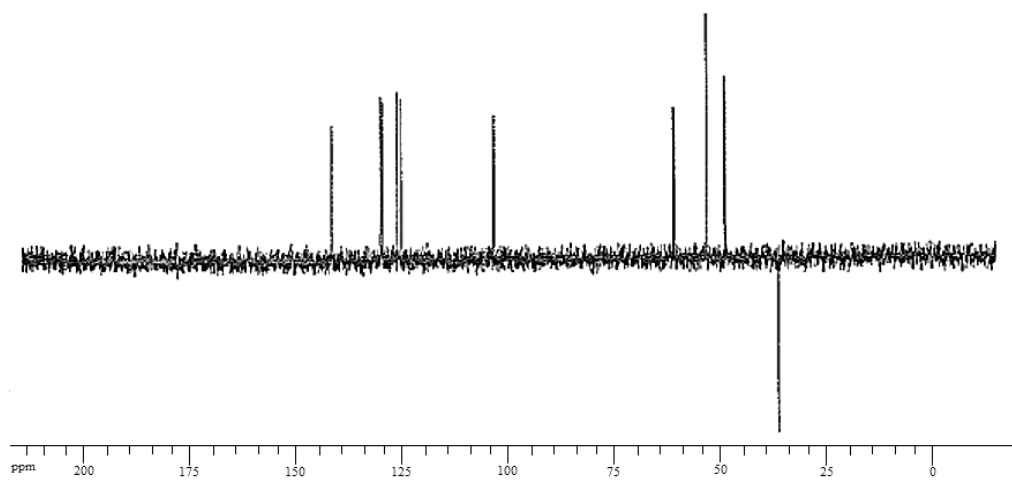
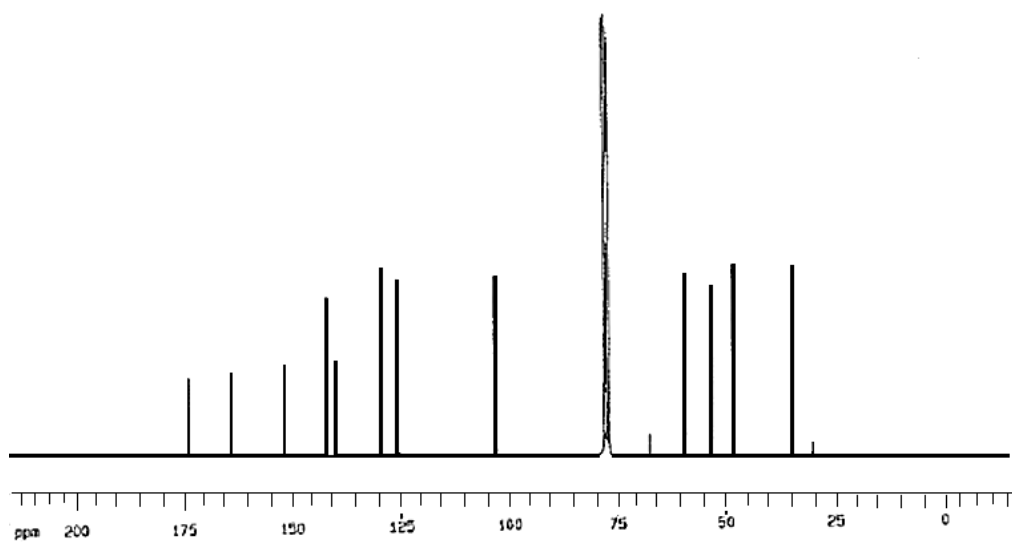
**IR (KBr)**  $\nu$  = 3024, 2950, 1732, 1699, 1464, 1426, 1380, 1261, 1196, 1148, 1014, 891, 760, 564  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 9.15 (s.an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH), 7.50-7.42 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.39-7.27 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.20-7.16 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.06 (d, 1H,  $J_d$  = 8.1 Hz, 6-H), 6.26 (t, 1H,  $J_t$  = 7.2 Hz, 1'β-H), 5.69 (d, 1H,  $J_d$  = 8.1 Hz, 5-H), 4.13 (t, 1H,  $J_t$  = 7.8 Hz, 3'β-H), 3.80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.98 (dt, 1H,  $J_d$  = 14.3 Hz,  $J_t$  = 7.2 Hz, 2'α-H), 2.37 (dt, 1H,  $J_d$  = 14.3 Hz,  $J_t$  = 7.0 Hz, 2'β-H).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 173.81 (C), 163.81 (C), 152.01 (C), 141.96 (CH), 141.55 (C), 139.67 (C), 130.07, 129.50, 125.88 y 125.31 (CH), 103.27 (CH), 59.28 (CH), 53.05 ( $\text{CH}_3$ ), 48.09 (CH), 35.39 ( $\text{CH}_2$ ).

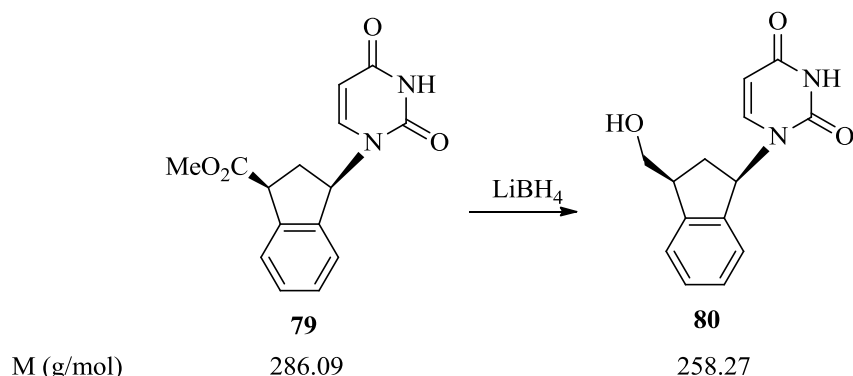
Análisis calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$  (286.28): C 62.93, H 4.93, N 9.79; encontrado C 62.79, H 5.14, N 9.91.







**4.25. (±)-*cis*-1-(3-Hidroximetil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (80).**



Sobre una suspensión de  $\text{LiBH}_4$  (32 mg; 1.4 mmol) en 1,4-dioxano (10 mL) se añadió, a  $0^\circ\text{C}$ , gota a gota y bajo atmósfera de argón, una disolución del éster **79** en 1,4-dioxano (15 mL). Finalizada la adición, se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. A continuación, se adicionó a  $0^\circ\text{C}$  y lentamente, una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 mL). Se extrajo con  $\text{AcOEt}$  (4 x 80 mL) y las fases orgánicas resultantes se lavaron con una solución saturada de  $\text{NaCl}$  y se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (7 g) utilizando como fase móvil  $\text{DCM/MeOH}$  (45:1), aislándose **80** como un sólido blanco (0.20 g; Rdto. 83%).

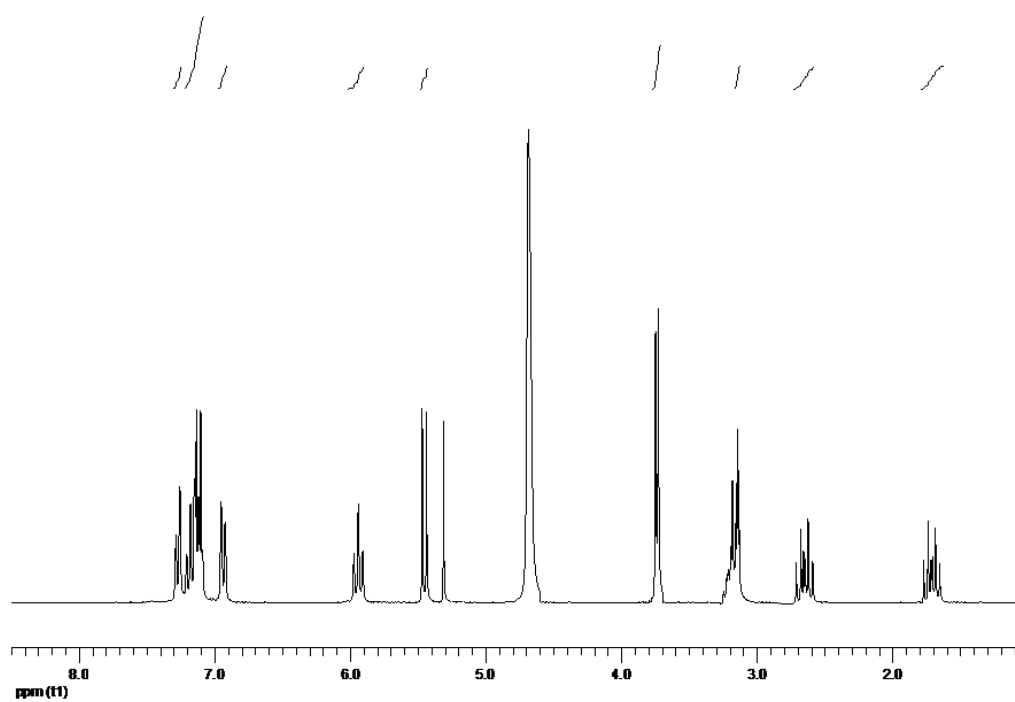
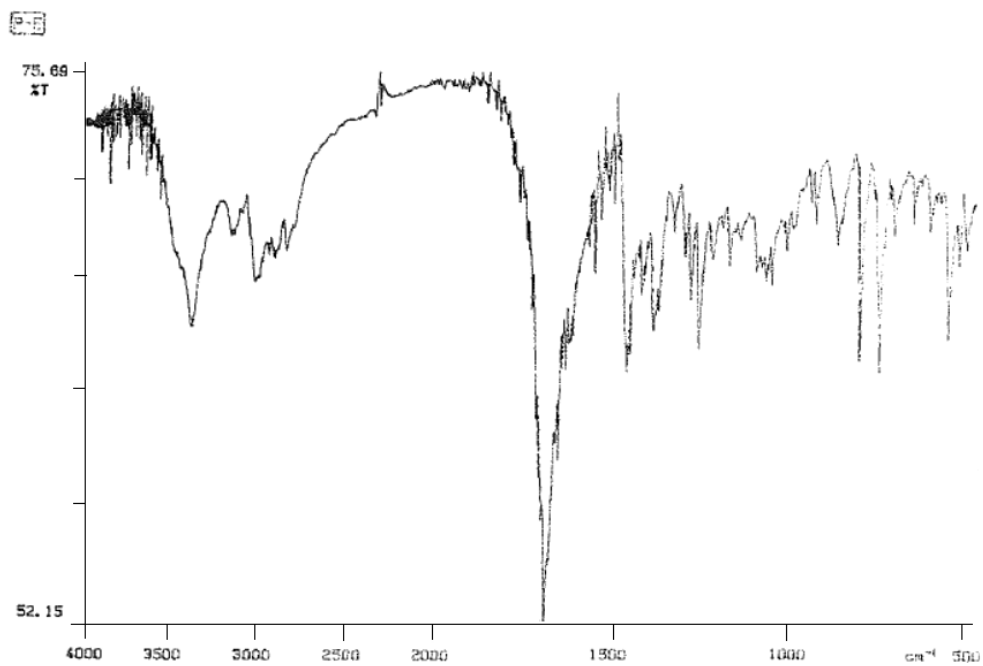
**Compuestos 80:** Sólido blanco, p.f.  $165\text{--}167^\circ\text{C}$ .

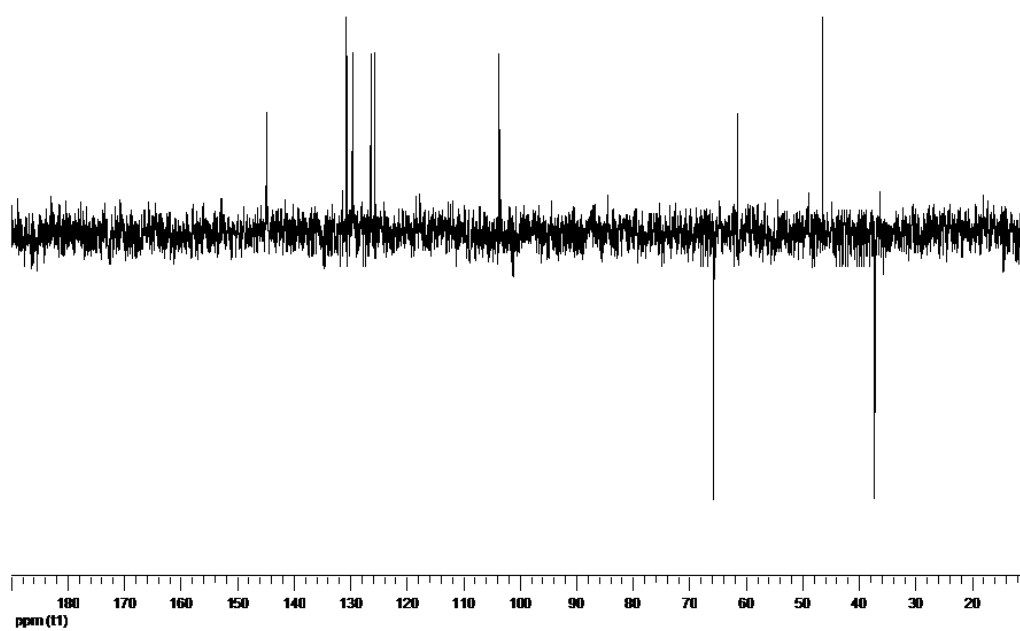
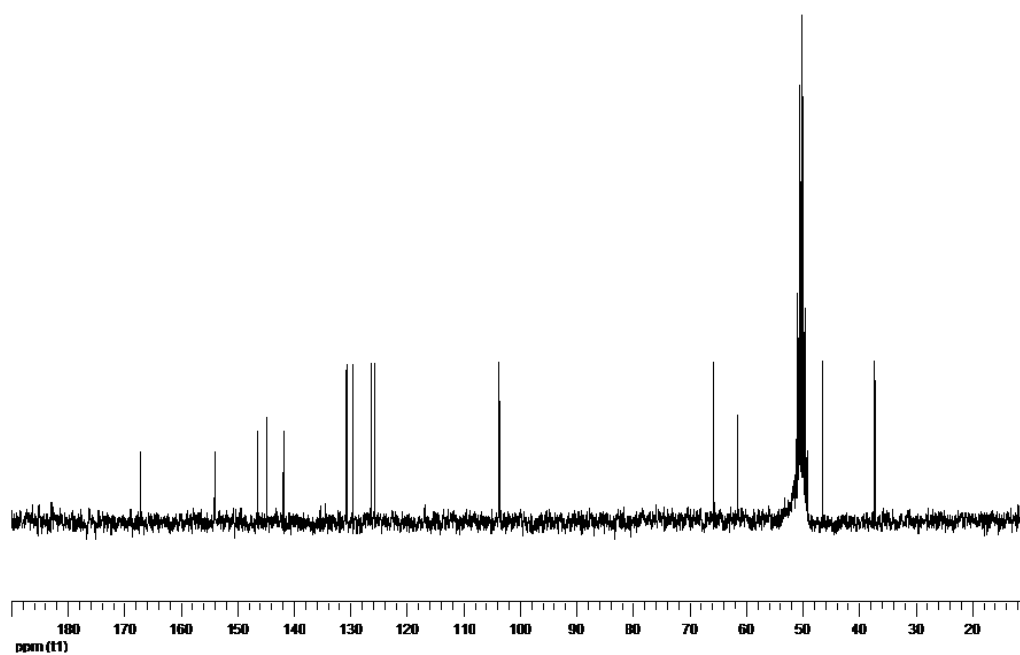
**IR (KBr)**  $\nu = 3381, 1164, 1446, 1395, 1269, 814, 758\text{ cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d$ )**  $\delta = 7.34$  (d, 1H,  $J_d = 7.3\text{ Hz}$ , 7'-H), 7.35-7.23 (m, 2H, 5'-H, 6'-H), 7.19 (d, 1H,  $J_d = 8.0\text{ Hz}$ , 6-H), 6.99 (d, 1H,  $J_d = 7.1\text{ Hz}$ , 4'-H), 5.98 (t, 1H,  $J_t = 8.1\text{ Hz}$ , 1' $\beta$ -H), 5.59 (d, 1H,  $J_d = 8.0\text{ Hz}$ , 5-H), 3.86-3.80 (parte A de un sistema ABM, 1H,  $J_{AB} = 11.1\text{ Hz}$ ,  $J_{AM} = 4.8\text{ Hz}$ ,  $\text{CHHOH}$ ), 3.80-3.74 (parte B de un sistema ABM, 1H,  $J_{BA} = 11.1\text{ Hz}$ ,  $J_{BM} = 5.6\text{ Hz}$ ,  $\text{CHHOH}$ ), 3.29-3.20 (m, 1H, 3' $\beta$ -H), 2.74 (dt, 1H,  $J_t = 13.5\text{ Hz}$ ,  $J_d = 8.4\text{ Hz}$ , 2' $\alpha$ -H), 1.76 (dt, 1H,  $J_t = 13.5\text{ Hz}$ ,  $J_d = 8.0\text{ Hz}$ , 2' $\beta$ -H).

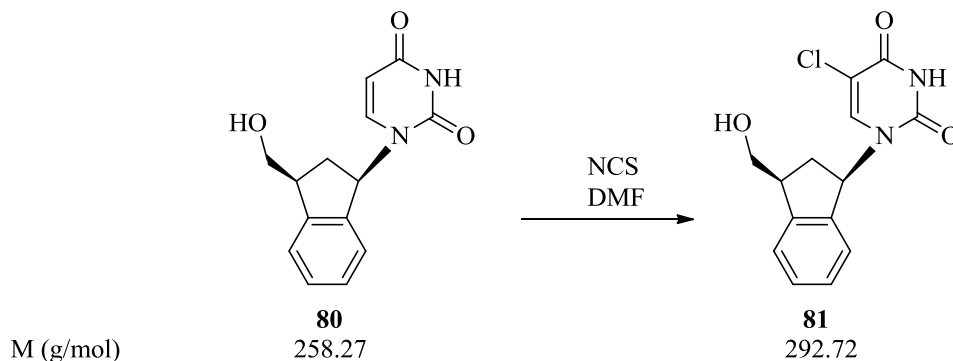
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d$ )**  $\delta = 167.15$  (C), 153.97 (C), 146.34 (C), 144.75 (CH), 141.78 (C), 130.61, 129.53, 126.28 y 125.64 (CH), 103.58 (CH), 65.60 ( $\text{CH}_2$ ), 61.33 (CH), 46.31 (CH), 37.06 ( $\text{CH}_2$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$  (258.27): C 65.11, H 5.46, N 10.85; encontrado C 64.89, H 5.54, N 10.9





**4.26. (±)-cis-5-Cloro-1-(3-hidroximetil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (81).**



Una disolución de **80** (32 mg; 0.12 mmol) y NCS (17.5 mg; 0.13 mmol) en DMF (10 mL) se agitó, bajo atmósfera de argón, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío, con la ayuda de repetidas adiciones y evaporaciones de tolueno. El residuo fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (1.6 g), usando como fase móvil  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (40:1), obteniéndose el compuesto **81** como un sólido blanco (15 mg; Rdto. 25%).

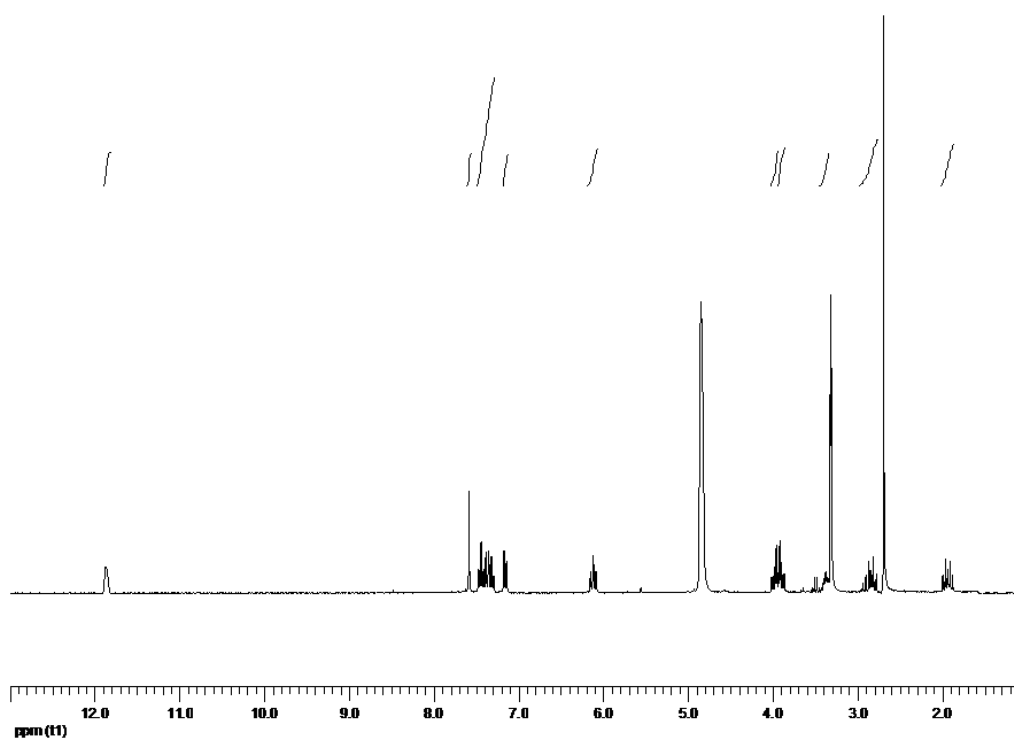
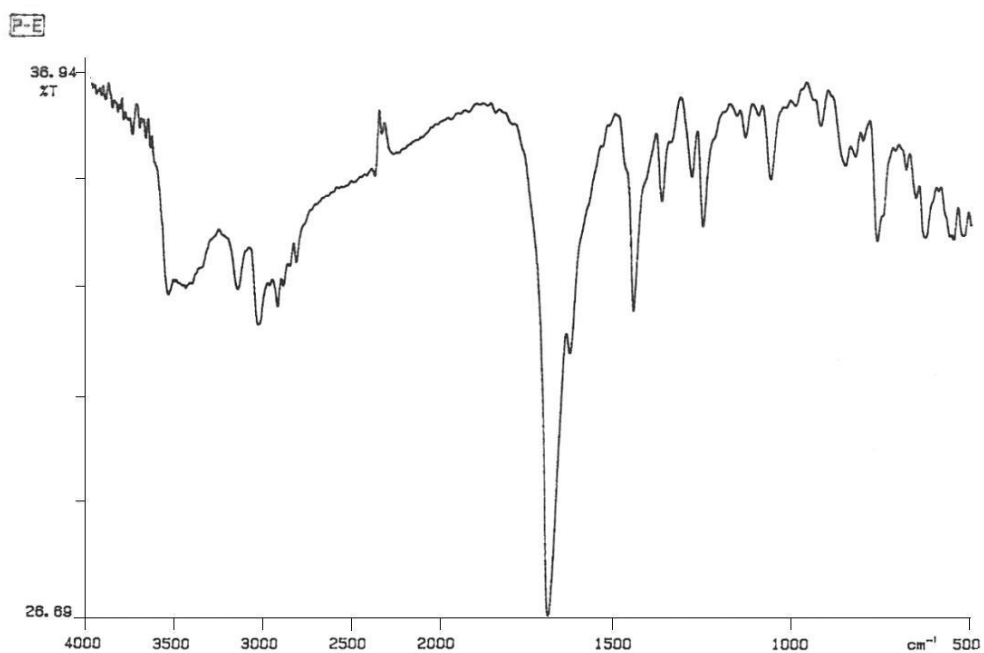
**Compuestos 81:** Sólido blanco, p.f. 248°C (por descomposición).

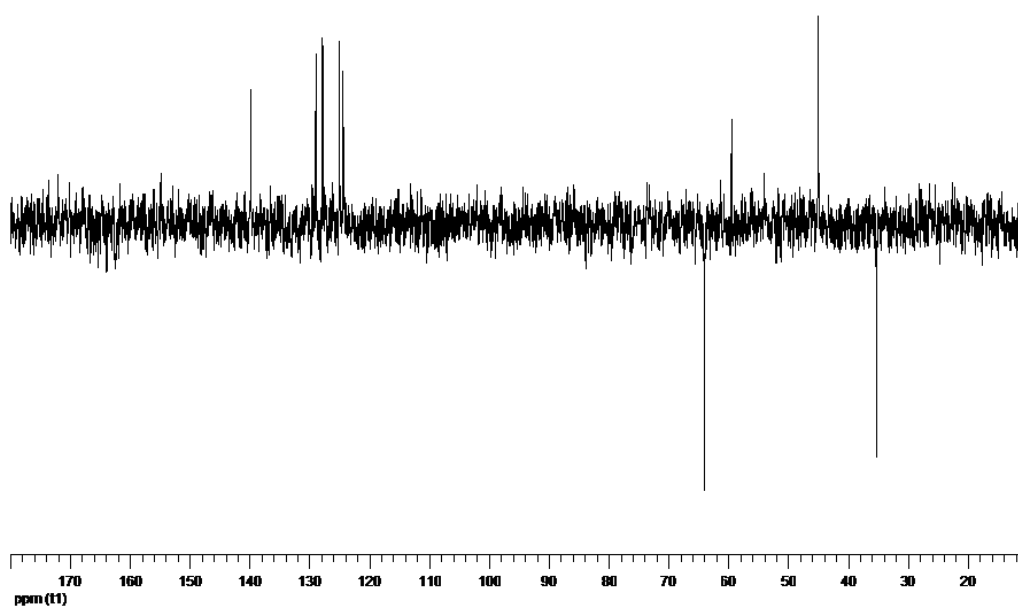
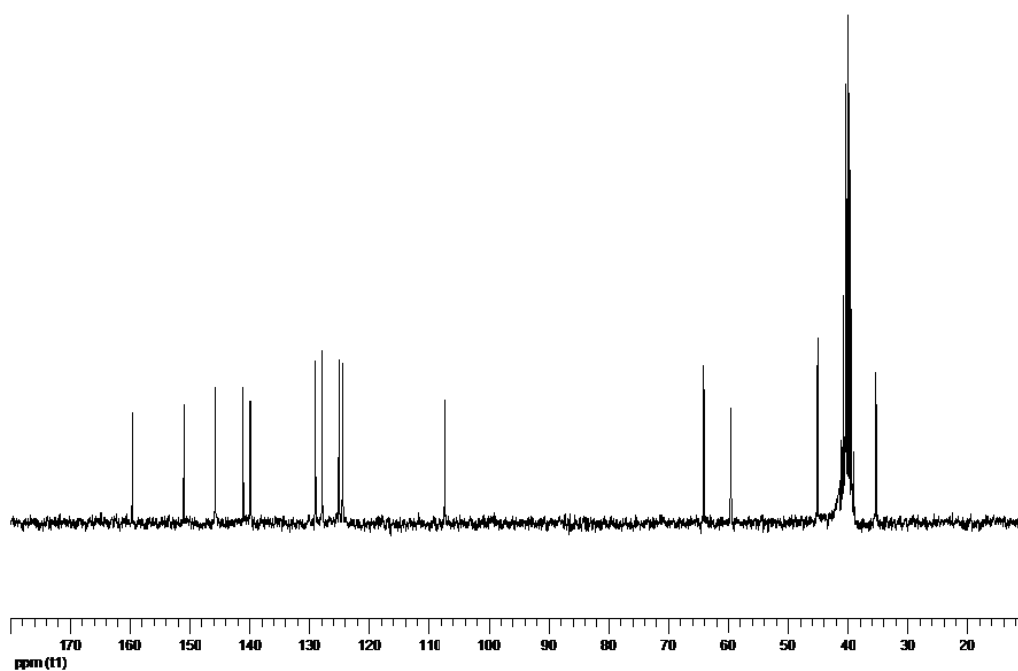
**IR (KBr)**  $\nu = 3546, 3262, 3036, 1689, 1454, 1376, 1259, 1069, 766 \text{ cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta = 11.87$  (s.an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH), 7.58 (s, 1H, 6-H), 7.46-7.28 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.15 (d, 1H,  $J_d = 7.2 \text{ Hz}$ ,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.11 (t, 1H,  $J_t = 8.0 \text{ Hz}$ , 1'β-H), 4.83 (s.an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , OH), 4.01-3.94 (parte A de un sistema ABM, 1H,  $J_{AB} = 11.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{AM} = 4.8 \text{ Hz}$ , CHHOH), 3.91-3.85 (parte B de un sistema ABM, 1H,  $J_{BA} = 11.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{BM} = 4.3 \text{ Hz}$ , CHHOH), 3.39-3.30 (m, 1H, 3'β-H), 2.83 (dt, 1H,  $J_t = 13.7 \text{ Hz}$ ,  $J_d = 8.6 \text{ Hz}$ , 2'α-H), 1.92 (dt, 1H,  $J_t = 13.7 \text{ Hz}$ ,  $J_d = 7.6 \text{ Hz}$ , 2'β-H).

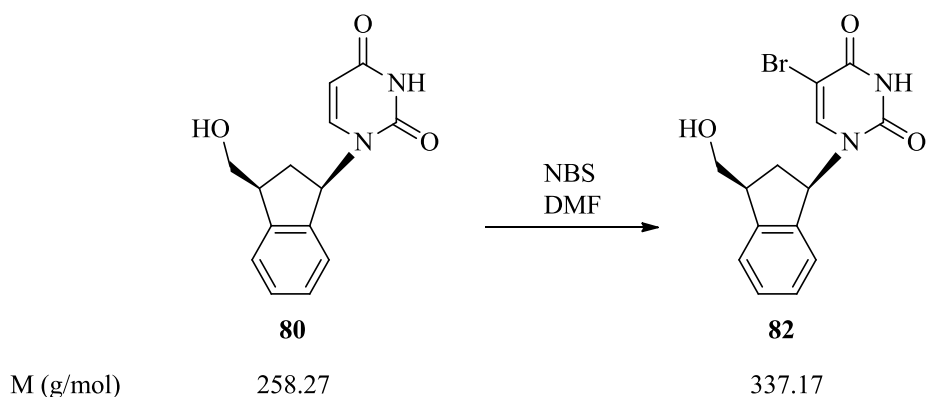
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta = 159.55$  (C), 150.92 (C), 145.66 (C), 140.99 (C), 139.80 (CH), 128.90, 127.78, 124.97 y 124.33 (CH), 107.25 (CH), 63.93 ( $\text{CH}_2$ ), 59.38 (CH), 44.88 (CH), 35.11 ( $\text{CH}_2$ ).

Análisis calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_3$  (292.72): C 57.44, H 4.48, N 9.57; encontrado C 57.13, H 4.79, N 9.69.





**4.27. (±)-cis-5-Bromo-1-(3-hidroximetil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (82).**



Siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado **4.26**, se preparó el compuesto **82** como un sólido blanco (30 mg; Rdto. 73%).

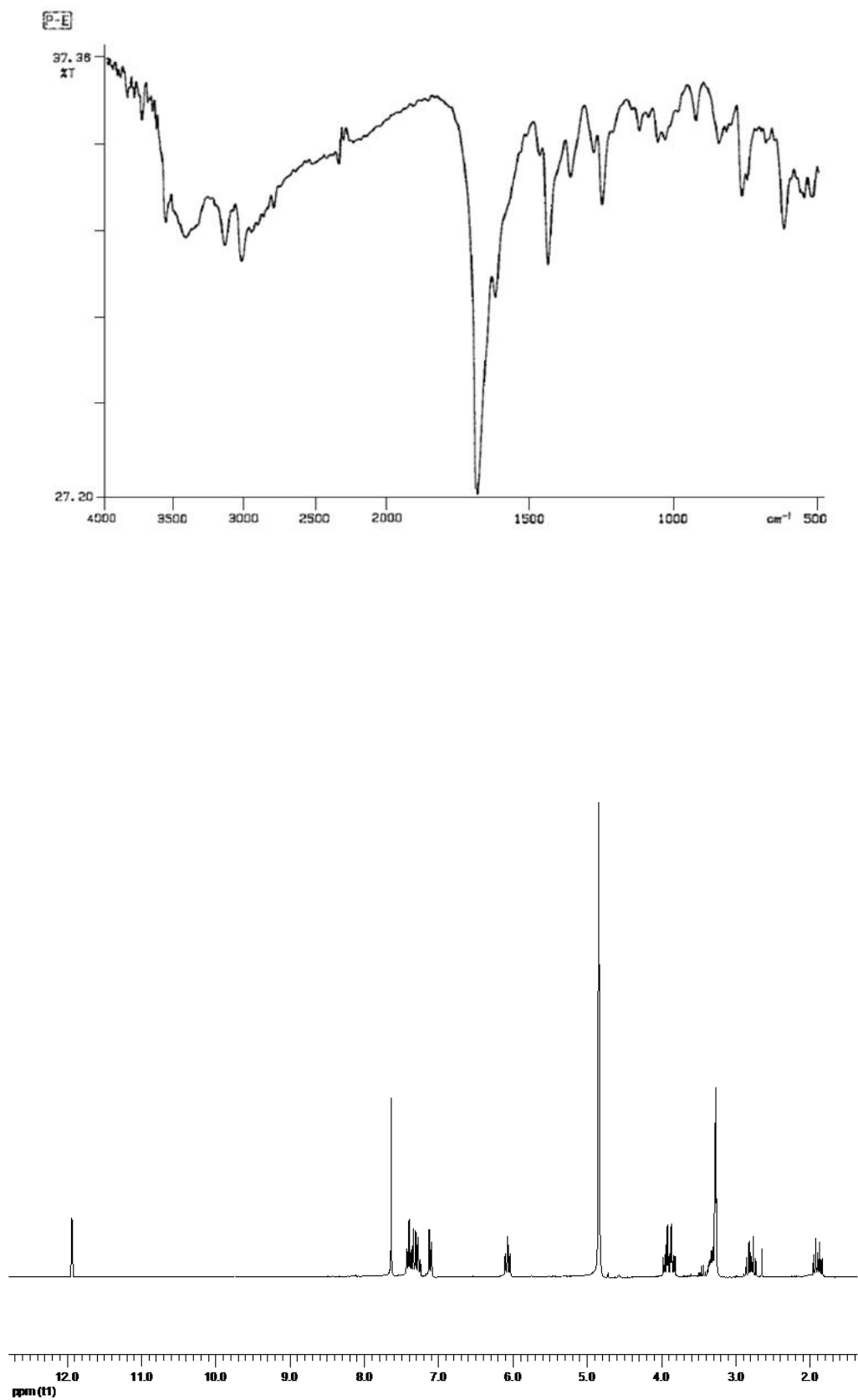
**Compuestos 82:** Sólido blanco, p.f. 246°C (por descomposición).

**IR (KBr)**  $\nu$  = 3037, 1858, 1687, 1502, 1446, 1326, 1262, 910, 768  $\text{cm}^{-1}$ .

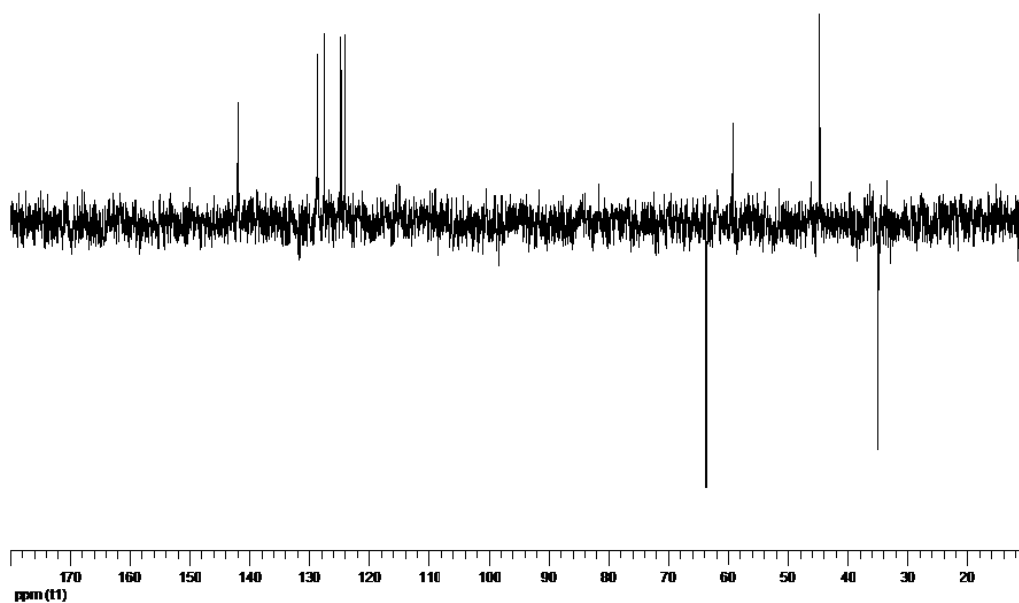
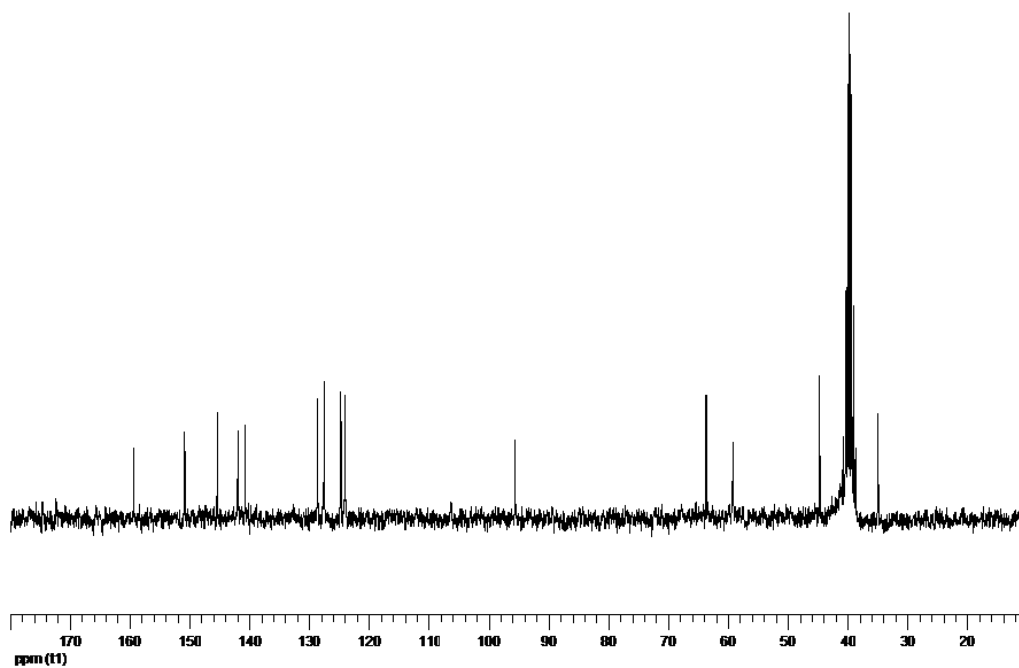
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta$  = 11.93 (s.an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH), 7.63 (s, 1H, 6-H), 7.42-7.24 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.11 (d, 1H,  $J_d = 7.5$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.07 (t, 1H,  $J_t = 8.0$  Hz, 1'β-H), 3.97-3.90 (parte A de un sistema ABM, 1H,  $J_{AB} = 11.0$  Hz,  $J_{AM} = 4.7$  Hz, CHH $\underline{\text{O}}$ H), 3.87-3.81 (parte B de un sistema ABM, 1H,  $J_{BA} = 11.0$  Hz,  $J_{BM} = 4.2$  Hz, CHH $\underline{\text{O}}$ H), 3.34-3.27 (m, 1H, 3'β-H), 2.78 (dt, 1H,  $J_t = 13.7$  Hz,  $J_d = 8.6$  Hz, 2'α-H), 1.89 (dt, 1H,  $J_t = 13.7$  Hz,  $J_d = 7.5$  Hz, 2'β-H).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta$  = 159.35 (C), 150.78 (C), 145.33 (C), 141.88 (CH), 140.69 (C), 128.57, 127.45, 124.64 y 123.98 (CH), 95.48 (CH), 63.51 ( $\text{CH}_2$ ), 59.02 (CH), 44.52 (CH), 34.74 ( $\text{CH}_2$ ).

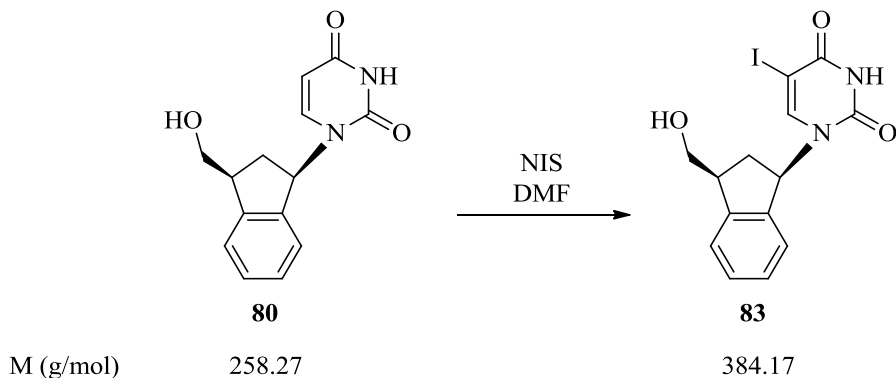
Análisis calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_3$  (337.17): C 49.87, H 3.89, N 8.31; encontrado C 49.63, H 4.13, N 8.42.







**4.28. (±)-cis-5-Yodo-1-(3-hidroximetil-1-indanil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-2,4-diona (83).**



Una disolución de **80** (32 mg; 0.11 mmol) y NIS (27 mg; 0.11 mmol) en ácido acético (10 mL) se agitó, bajo atmósfera de argón, durante 36 horas a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío y el residuo se disolvió en NaOH 0.5 M y posteriormente se neutralizó con HCl 0.5 M. Se concentró con ayuda de tolueno/etanol y fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (10.5 g), usando como fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (25:1), obteniéndose el compuesto **83** como un sólido blanco (25 mg; Rdto. 60%).

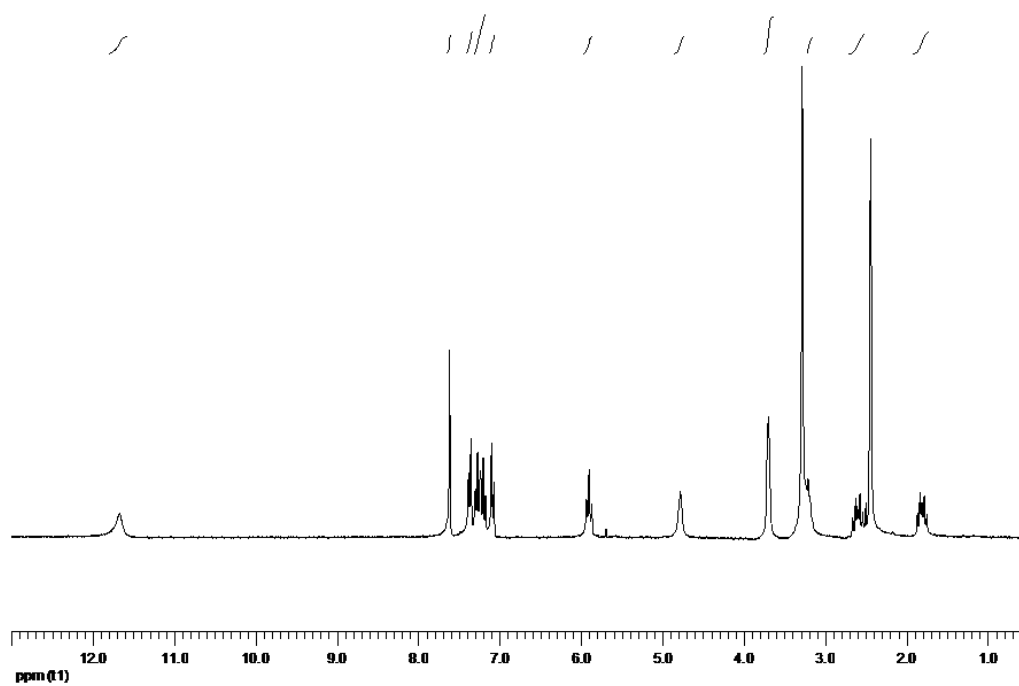
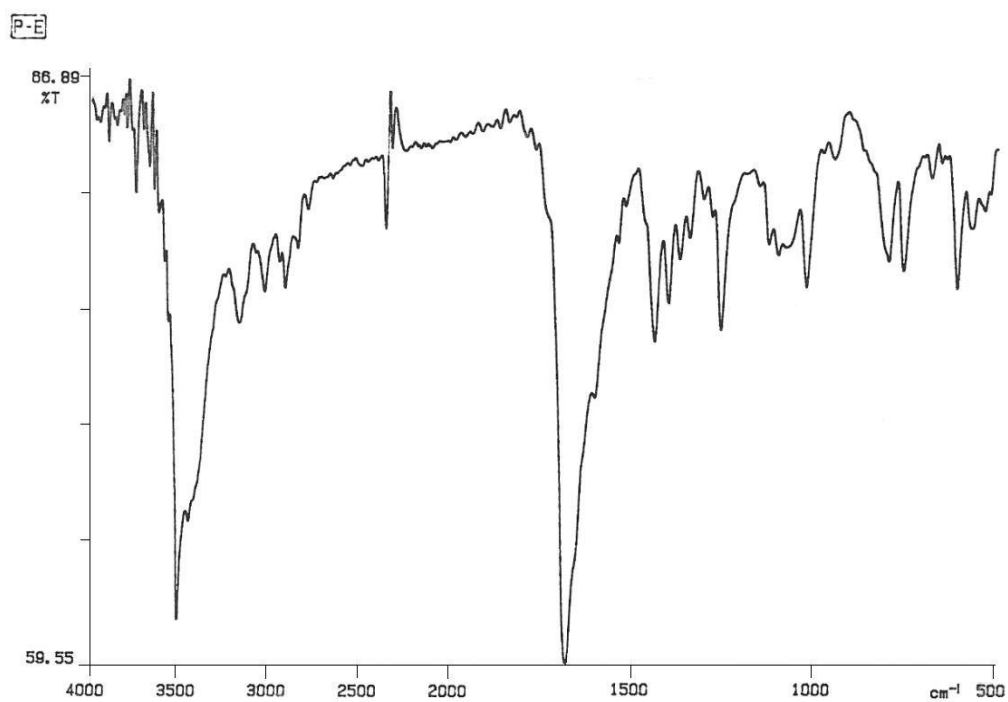
**Compuestos 83:** Sólido blanco, p.f. 225-227°C.

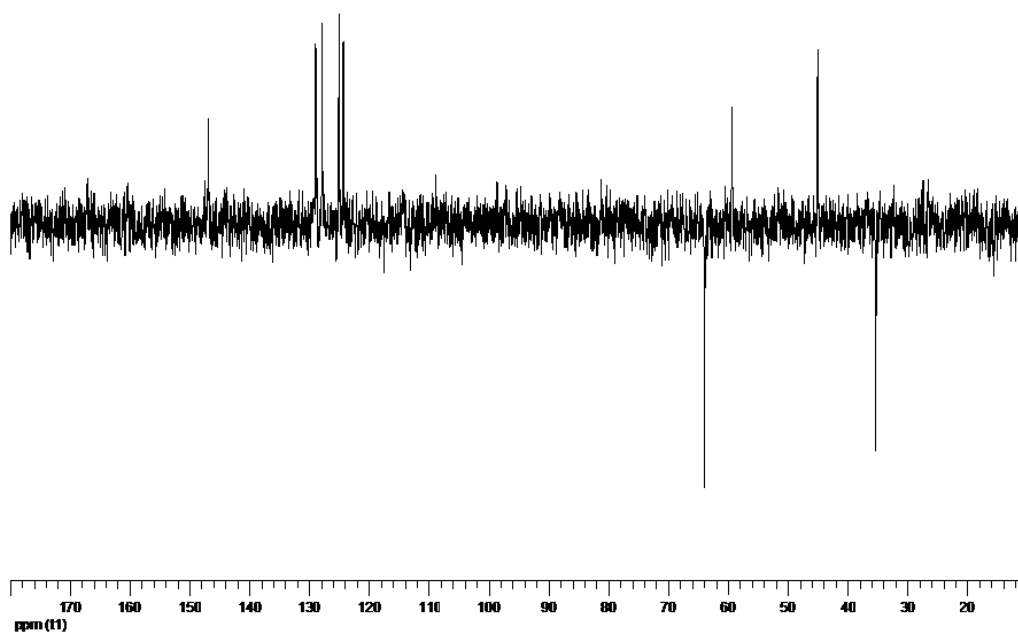
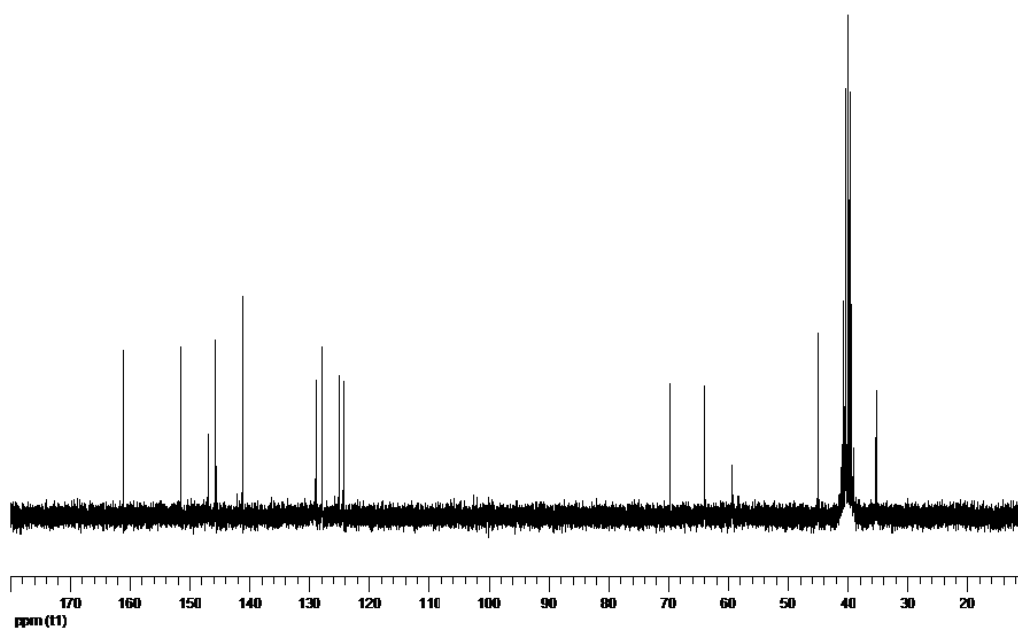
**IR (KBr)**  $\nu$  = 3505, 1681, 1492, 1327, 1261, 911, 756 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta$  = 11.67 (s.an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, NH), 7.61 (s, 1H, 6-H), 7.36 (d, 1H,  $J_d$  = 7.3 Hz, H<sub>arom</sub>), 7.23 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.08 (d, 1H,  $J_d$  = 7.3, H<sub>arom</sub>), 5.90 (t, 1H,  $J_t$  = 8.1 Hz, 1'β-H), 4.75 (s, 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, OH), 3.70 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.39-3.21 (m, 1H, 3'β-H), 2.60 (dt, 1H,  $J_t$  = 13.5 Hz,  $J_d$  = 8.6 Hz, 2'α-H), 1.81 (dt, 1H,  $J_t$  = 13.5 Hz,  $J_d$  = 7.6 Hz, 2'β-H).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta$  = 160.90 (C), 151.43 (C), 146.82 (CH), 145.63 (C), 141.09 (C), 128.85, 127.75, 124.97 y 124.20 (CH), 69.49 (C), 63.79 (CH<sub>2</sub>), 59.21 (CH), 44.87 (CH), 35.08 (CH<sub>2</sub>).

Análisis calculado para C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (384.17): C 43.77, H 3.41, N 7.29; encontrado C 43.56, H 3.79, N 7.41.





## ***5. ENSAYOS BIOLÓGICOS***



## 5. ENSAYOS BIOLÓGICOS

Los ensayos farmacológicos necesarios para determinar la actividad biológica de los diferentes análogos carbanucleosídicos preparados fueron realizados en el Rega Institute de la Universidad de Lovaina (Bélgica), por el equipo del Prof. Dr. Erik De Clercq.

Se determinó la actividad biológica (antiviral y citostática) de los compuestos descritos en esta memoria frente a diversos virus ADN y ARN, así como la citotoxicidad para diversas líneas celulares hospedadoras mediante protocolos normalizados.<sup>181,182</sup> Los resultados, comparados con los valores correspondientes a compuestos de propiedades antivíricas de referencia bien establecida, se indican en las tablas que siguen.

Las actividades inhibidora y citotóxica de los compuestos **63, 65, 68, 71, 72, 73, 81, 82 y 83** se evaluaron contra los virus Parainfluenza 3, Reovirus-1, Sindbis, Coxsackie B4 y Punta de toro en cultivos de células renales de mono verde africano (Vero); Herpes simplex tipo 1 (KOS), Herpes simplex tipo 2 (cepa G), Vaccinia, Estomatitis vesicular y Herpes simplex tipo 1 (TK<sup>-</sup> KOS AVC) en cultivos de células embrionarias de pulmón humano (HEL); Estomatitis vesicular, virus sincitial respiratorio y Coxsackie B4 en cultivos de células epiteliales humanas (HeLa). Estas actividades se compararon con las de aciclovir (ACV), ganciclovir (GCV), brivudina (BVDU), (S)-9-(2,3-dihidroxipropil)adenina [(S)-DPHA], rivabirina y el polímero sulfatado DS-5000 (**Tablas 1, 2 y 3**).

Estos mismos compuestos fueron ensayados contra las cepas Davis y AD-169 de citomegalovirus (CMV) y contra el virus de Varicela zoster (cepas TK<sup>+</sup> VVZ, timidinoquinasa positivo y TK<sup>-</sup> VVZ, timidinoquinasa deficiente) en cultivos de células embrionarias del pulmón humano (HEL). Sus actividades fueron comparadas con GCV y cidofovir para CMV, y con las ACV y BVDU en el caso de VZV (**Tablas 4 y 5**).

También se ensayaron contra coronavirus felino y virus herpes felino en cultivos de células Crandell-Rees de riñón de gato (CRFK) y se compararon frente a las de GCV, aglutinina de *Urtica dioica* (UDA) y aglutinina de *Hyppeastrum* híbrido (**Tabla 6**).

Por último, la actividad antivírica y citotóxica fueron ensayadas contra cepas A/HK/7/87 y X-31 (quimérica) del virus Influenza A, y contra la cepa HK/5/72 del virus Influenza B en cultivos de células Madin-Darby de riñón de perro (MDCK). Estos datos fueron comparados con los diversos compuestos de referencia: el carboxilato de oseltamivir (forma activa de

---

<sup>181</sup> (a) De Clercq, E.; Holý, A.; Rosenberg, I.; Sakuma, T.; Maudgal, P. C. *Nature* **1986**, 323, 464. (b) Balzarini, J.; Naesens, L.; Slachmuylders, J.; Nijphus, H.; Rosenberg, I.; Holý, A.; Schellekens, H.; De Clercq, E. *AIDS* **1991**, 5, 21.

<sup>182</sup> De Clercq, E. "In vitro and ex vivo test systems to rationalize drug design and delivery", Crommelin, D.; Couvreur, P., eds. Editions de Santé, Paris, Francia, **1994**, p. 108-125 y referencias allí citadas.

Tamiflu®) y la ribavirina resultaron activos contra virus influenza ya que sus valores de  $CI_{50}$  son claramente inferiores a sus valores CCM (concentraciones causantes de toxicidad mínima).

Para la amantadina y la rimantidina, la mejor actividad se observó con la cepa H3N2. Se sabe que estos compuestos son inactivos contra Influenza B. Además, la cepa quimérica A/X-31 que se utilizó en estos ensayos es menos sensible a amantadina y rimantidina (**Tabla 7 y 8**).

La actividad antivírica se expresa como  $CI_{50}$  (concentración inhibitoria 50) o concentración inhibitoria mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) requerida para reducir en un 50% la citopatogenicidad inducida por virus o como  $CE_{50}$  (concentración efectiva 50), que se define como la concentración efectiva requerida para reducir la formación de placas virales en un 50%.

La citotoxicidad o concentración se expresa como  $CC_{50}$ , concentración de compuesto necesaria para reducir el crecimiento celular normal en un 50% en relación al número de células en controles sin tratar, o como concentración citostática mínima (CCM), concentración del compuesto que causa una alteración microscópicamente detectable de la morfología de las células en los cultivos expuestos a los compuestos.

La mayoría de los compuestos ensayados se caracterizan por carecer de actividad apreciable a concentraciones subcitotóxicas (mínimo efecto antivírico  $\geq 5$  veces inferior a la mínima concentración citotóxica), o a las mayores concentraciones ensayadas (100  $\mu\text{g/mL}$ ). Existen una serie de excepciones como son el compuesto **73** el cual presentó una actividad moderada contra Varicela zoster (cepa  $TK^+$ , timidinoquinasa positivo), Vaccinia, Herpes simplex tipo 1 (KOS) y Herpes simplex tipo 2 (cepa G) en cultivos de células embrionarias de pulmón humano HEL con valores  $EC_{50}$  de 6.0, 12.0, 12.0 y 12.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente y los compuestos **68** y **72** una actividad antiviral moderada contra el virus de Cocksackie en cultivos celulares VERO con unos valores de  $EC_{50}$  de 12  $\mu\text{g/mL}$ .



**Tabla 1. Actividad antiviral\* y citotoxicidad\*\* de los compuestos ensayados en cultivos de células renales de mono verde africano (Vero).**

Compuesto	Citotoxicidad CCM (µg/mL)	Virus (cepa) CE <sub>50</sub> (µg/mL)				
		Virus Parainfluenza-3	Reovirus-1	Sindbis	Virus Coxsackie	Virus Punta toro
<b>63</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>65</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>68</b>	100	>20	>20	>20	12	20
<b>71</b>	>100	>100	>100	>100	60	>100
<b>72</b>	100	>20	>20	>20	12	12
<b>73</b>	20	>4	>4	>4	>4	>4
<b>81</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>82</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>83</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>BVDU<sup>a</sup></b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250
<b>(S)-DHPA<sup>a</sup></b>	>250	250	>250	>250	>250	>250
<b>Rivabirina<sup>a</sup></b>	>250	150	250	150	>250	150

\* CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50, o concentración efectiva requerida para reducir la formación de placas virales en un 50%.

\*\* CCM: Concentración citotóxica mínima (µg/mL), o concentración mínima requerida para causar una alteración microscópica detectable en la morfología celular.

<sup>a</sup> Unidades µM.

**Tabla 2. Actividad antiviral\* y citotoxicidad\*\* de los compuestos ensayados en cultivos de células embrionarias de pulmón humano (HEL).**

Compuesto	Citotoxicidad CCM (µg/mL)	Virus (Cepa) CE <sub>50</sub> (µg/mL)				
		VHS-1 (KOS)	VHS-2 (G)	Virus Vaccinia	Virus Estomatitis Vesicular	VHS-1 (TK <sup>-</sup> KOS ACV)
<b>63</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>65</b>	>100	>100	60	>100	>100	>100
<b>68</b>	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<b>71</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>72</b>	100	>20	20	>20	>20	>20
<b>73</b>	100	12	12	12	>20	20
<b>81</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>82</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>83</b>	>100	100	>100	>100	>100	>100
<b>BVDU<sup>a</sup></b>	>250	0.08	10	6	>250	250
<b>Ribavirina<sup>a</sup></b>	>250	>250	250	150	150	>250
<b>ACV<sup>a</sup></b>	>250	0.4	0.4	>250	>250	150
<b>DHPG<sup>a</sup></b>	>100	0.032	0.032	>100	>100	4

\* CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50, o concentración efectiva requerida para reducir la formación de placas virales en un 50%.

\*\* CCM: Concentración citotóxica mínima (µg/mL), o concentración mínima requerida para causar una alteración microscópica detectable en la morfología celular.

<sup>a</sup> Unidades µM.

**Tabla 3. Actividad antiviral\* y citotoxicidad\*\* de los compuestos ensayados en cultivos de células epiteliales humanas (HeLa).**

Compuesto	Citotoxicidad CCM (µg/mL)	Virus (Cepa) CE50 (µg/mL)		
		Virus Estomatitis vesicular	Virus Coxsackie B4	Virus respiratorio sincitial
<b>63</b>	>100	>100	>100	>100
<b>65</b>	>100	>100	>100	>100
<b>68</b>	100	>20	>20	>20
<b>71</b>	>100	60	>100	>100
<b>72</b>	100	>20	>20	>20
<b>73</b>	20	>4	>4	>4
<b>81</b>	>100	>100	>100	>100
<b>82</b>	>100	>100	>100	>100
<b>83</b>	>100	60	>100	>100
<b>BVDU<sup>a</sup></b>	>250	>250	>250	>250
<b>(S)-DHPA<sup>a</sup></b>	>250	30	>250	50
<b>Rivabirina<sup>a</sup></b>	>250	30	150	30

\* CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50, o concentración efectiva requerida para reducir la formación de placas virales en un 50%.

\*\* CCM: Concentración citotóxica mínima (µg/mL), o concentración mínima requerida para causar una alteración microscópica detectable en la morfología celular.

<sup>a</sup> Unidades µM.

**Tabla 4. Actividad antiviral\* frente a citomegalovirus (CMV) y citotoxicidad\*\* de los compuestos ensayados en cultivos de células embrionarias de pulmón humano (HEL).**

Compuesto	Actividad antiviral (CE <sub>50</sub> , µg/mL)		Citotoxicidad (µg/mL)	
	CMV (AD-169)	CMV (Davis)	Morfología Celular (CCM)	Crecimiento Celular (CC <sub>50</sub> )
<b>63</b>	>100	>100	>100	>100
<b>65</b>	>100	76.5	>100	70.9
<b>68</b>	>20	44.7	≥100	42.2
<b>71</b>	>100	>100	>100	100
<b>72</b>	>4	>0.8	≥4	51.8
<b>73</b>	>4	>4	20	11.8
<b>81</b>	>100	>100	>100	>100
<b>82</b>	>20	>20	>100	>100
<b>83</b>	>100	63.1	>100	>100
<b>DHPG</b>	3.2	0.64	≥400	56.2
<b>Cidofovir</b>	0.49	0.13	≥80	17

\* CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50, o concentración efectiva requerida para reducir la formación de placas virales en un 50%.

\*\* CCM: Concentración citotóxica mínima (µg/mL), o concentración mínima requerida para causar una alteración microscópica detectable en la morfología celular. CC<sub>50</sub>: Concentración citotóxica 50, o concentración requerida para reducir al 50% el crecimiento celular.

**Tabla 5. Actividad antiviral\* frente al virus de varicela zoster (VVZ) y citotoxicidad\*\* de los compuestos ensayados en cultivos de células embrionarias de pulmón humano.**

Compuesto	Actividad antiviral (CE <sub>50</sub> , µg/mL)		Citotoxicidad (µg/mL)	
	VVZ TK <sup>+</sup> (OKA)	VVZ TK <sup>-</sup> (07/1))	Morfología celular (CCM)	Crecimiento celular (CC <sub>50</sub> )
<b>63</b>	>100	>100	>100	>100
<b>65</b>	>100	>100	>100	70.9
<b>68</b>	55.7	100	>100	42.2
<b>71</b>	>100	>100	>100	100
<b>72</b>	>20	>20	100	51.8
<b>73</b>	6.0	>4	≥20	11.8
<b>81</b>	100	>100	>100	>100
<b>82</b>	>100	>100	>100	>100
<b>83</b>	>100	>100	>100	>100
<b>ACV</b>	0.3	14	>400	176
<b>BVDU</b>	0.0024	52.3	>400	144

\* CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50, o concentración efectiva requerida para reducir la formación de placas virales en un 50%.

\*\* CCM: Concentración citotóxica mínima (µg/mL), o concentración mínima requerida para causar una alteración microscópica detectable en la morfología celular. CC<sub>50</sub>: Concentración citotóxica 50, o concentración requerida para reducir al 50% el crecimiento celular.

**Tabla 6. Actividad antiviral y citotóxica de los compuestos ensayados contra coronavirus felino y virus del herpes felino en células Crandell-Rees de riñón de gato (CRFK).**

Compuesto	Crecimiento celular CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)	EC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (µg/mL)	
		Coronavirus felino	Virus herpes felino
<b>63</b>	>100	>100	>100
<b>65</b>	>100	>100	>100
<b>68</b>	98.8	>20	>20
<b>71</b>	>100	>100	>100
<b>72</b>	45.8	>20	>20
<b>73</b>	9.9	>4	>4
<b>81</b>	>100	>100	>100
<b>82</b>	>100	>100	>100
<b>83</b>	56.2	>20	>20
<b>HHA</b>	>100	9.6	1.3
<b>UDA</b>	>100	9.6	6.8
<b>GCV (µM)</b>	>100	>100	1.0

<sup>a</sup> CC<sub>50</sub>: Concentración citotóxica 50, o concentración requerida para reducir al 50% el crecimiento celular.

<sup>b</sup> CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50, o concentración efectiva requerida para reducir la formación de placas virales en un 50%.

**Tabla 7. Actividad antiviral\* y citotóxica\*\* de los compuestos ensayados contra virus influenza A en cultivos celulares Madin-Darby de riñón de perro MDCK.**

Compuesto	Unidades de Concentración	Citotoxicidad		Influenza A X-31 (EC <sub>50</sub> )		Influenza A(H3N2) A/HK/7/87 (EC <sub>50</sub> )	
		CC <sub>50</sub>	CCM	ECP <sup>a</sup> Visual	MTS <sup>b</sup>	ECP Visual	MTS
<b>63</b>	µg/mL	>100	≥100	N. A. <sup>c</sup>	N. A.	50	49.5
<b>65</b>	µg/mL	>100	≥100	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
<b>68</b>	µg/mL	>100	100	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
<b>71</b>	µg/mL	57.5	100	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
<b>72</b>	µg/mL	33.4	20	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
<b>73</b>	µg/mL	5.7	4	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
<b>81</b>	µg/mL	>100	100	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
<b>82</b>	µg/mL	81.3	100	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
<b>83</b>	µg/mL	>100	100	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
<b>Carboxilato de oseltamivir</b>	µM	>100	>100	0.01	0.02	0.6	0.3
<b>Ribavirina</b>	µM	>100	100	9	7.0	9	4.8
<b>Amantadina</b>	µM	>100	>100	100	>100	13.3	6.7
<b>Rimantadina</b>	µM	>100	>100	20	63.9	0.8	0.6

\* CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50, o concentración efectiva requerida para reducir la formación de placas virales en un 50%.

\*\*CC<sub>50</sub>: Concentración citotóxica 50, o concentración requerida para reducir al 50% el crecimiento celular. CCM: Concentración citotóxica mínima (µg/mL), o concentración mínima requerida para causar una alteración microscópica detectable en la morfología celular.

<sup>a</sup> ECP: efecto citopatogénico.

<sup>b</sup> NA: inactivo a la mayor concentración ensayada o a concentración subtóxica.

**Tabla 8. Actividad antiviral\* y citotóxica\*\* de los compuestos ensayados contra virus influenza B en cultivos celulares Madin-Darby de riñón de perro MDCK.**

Compuesto	Unidades de Concentración	Influenza B B/HK/5/72 (EC <sub>50</sub> )	
		ECP <sup>a</sup> Visual	MTS <sup>b</sup>
63	µg/mL	N.A <sup>c</sup>	N.A
65	µg/mL	N.A	N.A
68	µg/mL	N.A	N.A
71	µg/mL	N.A	N.A
72	µg/mL	N.A	N.A
73	µg/mL	N.A	N.A
81	µg/mL	N.A	N.A
82	µg/mL	N.A	N.A
83	µg/mL	N.A	N.A
<b>Carboxilato de oseltamivir</b>	µM	N.A	N.A
<b>Ribavirina</b>	µM	N.A	N.A
<b>Amantadina</b>	µM	N.A	N.A
<b>Rimantadina</b>	µM	N.A	N.A

\* CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50, o concentración efectiva requerida para reducir la formación de placas virales en un 50%.

\*\* CC<sub>50</sub>: Concentración citotóxica 50, o concentración requerida para reducir al 50% el crecimiento celular. CCM: Concentración citotóxica mínima (µg/mL), o concentración mínima requerida para causar una alteración microscópica detectable en la morfología celular.

<sup>a</sup> ECP: efecto citopatogénico.

<sup>b</sup> NA: inactivo a la mayor concentración ensayada o a concentración subtóxica.



## ***6. CONCLUSIONS***



1. A synthetic process has been developed to obtain, by a divergent synthetic strategy, new carbocyclic analogues of nucleosides derived from indan bearing purine bases (**63**, **65**, **68**, **71**, **72**, and **73**) from the mixture of diols ( $\pm$ )-*cis*-3-hydroxymethyl-1-indanol, **55a**, and ( $\pm$ )-*trans*-3-hydroxymethyl-1-indanol, **55b**, previously obtained from phenyl succinic anhydride.
2. We have developed a method which allows to obtain, by a divergent synthetic strategy, new carbocyclic nucleoside analogues derived from indan bearing pyrimidine bases (**81**, **82**, and **83**), from ( $\pm$ )-*cis*-3-amino-1-indan carboxylate hydrochloride, **75**, which we have previously prepared from phenyl succinic anhydride.
3. All these compounds have been subjected to a spectroscopy analysis IR,  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR for their identification and structural characterization.
4. The different carbocyclic analogues prepared (**63**, **65**, **68**, **71**, **72**, **73**, **80**, **81**, **82**, and **83**) were evaluated for antiviral activity against a wide variety of viruses, including Para-influenza-3 virus, Reovirus-1, Sindbis, Coxsackie virus B4 and Punta Toro virus in african green monkey kidney (Vero) cell cultures.

Herpes simplex virus type 1 (strain KOS), Herpes simplex virus type 2 (strain G), Vaccinia virus, Herpes simplex type 1 ( $\text{TK}^-$  KOS AVC) and Vesicular Stomatitis virus in human embryonic lung (HEL) cell cultures. Vesicular Stomatitis virus, Respiratory Syncytial virus and Coxsackie virus B4 in human epithelial carcinoma (HeLa) cell cultures. Cytomegalovirus (AD 169 and David strains) and Varicella-zoster virus ( $\text{TK}^+$  VZV and  $\text{TK}^-$  VZV strains) in human embryonic lung (HEL) cell cultures.

Feline coronavirus and Feline herpes virus in Crandell-Rees feline kidney (CRFK) cell cultures, and Influenza A virus (A/HK/7/87 y X-31 strains), and Influenza B virus (HK/5/72 strain) in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell culture.

This evaluation showed that most of the tested compounds have not appreciable activity with the exception of compound **73**, which showed moderate antiviral effects against Varicella-zoster virus ( $\text{TK}^+$  VZV strain), Vaccinia, Herpes simplex type 1 (KOS), and Herpes simplex type 2 (G strain) in HEL cell cultures, and compounds **68** and **72**, which showed moderate antiviral effects against Coxsackie virus B4 in Vero cell cultures.



***CAPÍTULO 2: DESARROLLO DE NUEVOS NEUROPROTECTORES  
DERIVADOS DEL INDANO COMO NUEVA ESTRATEGIA  
TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE LAS  
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS***



## ***1. INTRODUCCIÓN***





## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

#### **1.1.1. Aspectos generales**

Las enfermedades neurodegenerativas (END) suponen, junto con las enfermedades vasculares y las oncológicas, la principal causa de mortalidad y morbilidad en la población española. En la actualidad, algo más de 800.000 personas están diagnosticadas en nuestro país con alguna END. Estas enfermedades se caracterizan por la pérdida selectiva de poblaciones específicas de neuronas, la cual determinará su presentación clínica.<sup>1,2</sup> Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer (EA) se observa una disminución de neuronas colinérgicas fundamentalmente en el hipocampo y la amígdala, apareciendo alteraciones en los procesos de memoria y lenguaje, mientras que en la enfermedad de Parkinson (EP) son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y ganglios basales las afectadas, que se refleja con una modificación en el control y la coordinación del movimiento, y en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) se reduce la población de motoneuronas, provocando una debilidad progresiva.

Se conocen más de 100 enfermedades neurodegenerativas; las de Alzheimer, Parkinson, Huntington, y la Esclerosis Lateral Amiotrófica son las más importantes ya sea por su frecuencia o por su gravedad.

En la actualidad y en la búsqueda de nuevos principios activos que interfieran en los procesos neurodegenerativos, la farmacología mantiene abiertas dos grandes líneas de investigación. La primera de ellas es la etiopatogénica, que tiene como objetivo detener la muerte celular y fomentar la recuperación de las poblaciones celulares ya afectadas, mediante la búsqueda de fármacos que modulen las rutas bioquímicas implicadas en estos procesos. La segunda línea de actuación, mucho más avanzada hasta la fecha, es la fisiopatológica, que busca prevenir, retardar o paliar la aparición de la sintomatología propia de la alteración de los niveles de neurotransmisores, y presentar como objetivo principal el mantenimiento de los mismos.<sup>3</sup>

La unidad funcional del sistema nervioso es la neurona, célula especializada que se caracteriza por su excitabilidad y conductibilidad. La excitabilidad de la neurona se debe a pequeñas alteraciones del potencial transmembrana. La conductibilidad es la capacidad de transmitir la excitabilidad a otras células distintas.

---

<sup>1</sup> Kovacs, G. G.; Budka, H. *Focus on Structural Biology* **2009**, 7, 251.

<sup>2</sup> Gibrat, C.; Cicchetti, F. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2011**, 35, 380.

<sup>3</sup> Segura, T.; Galindo, M. F.; Rallo-Gutierrez, B.; Ceña, V.; Jordán, J. *Rev. Neurol.* **2003**, 36 (11), 1047.

Para ello las neuronas liberan compuestos químicos llamados neurotransmisores. Existen tres clases principales de neurotransmisores: aminas biogénicas, determinados aminoácidos y ciertos péptidos. Los neurotransmisores se liberan en la superficie presináptica y se ligan a sus correspondientes receptores de la superficie post-sináptica produciendo un cambio en el potencial de acción post-sináptico.<sup>4</sup>

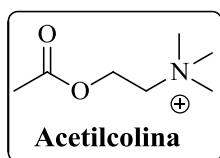
Se han descrito en determinadas END, alteraciones en los niveles de algunos neurotransmisores.

Así, se ha observado una disminución de acetilcolina en la EA y de dopamina en la EP, mientras que en la ELA se han descrito incrementos en la concentración de glutamato.

### 1.1.2. Neurotransmisores

#### 1.1.2.1. Acetilcolina

Es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso Central (SNC) y en el



Sistema Nervioso Periférico (SNP). Su función, al igual que la de otros neurotransmisores, es mediar en la actividad sináptica del sistema nervioso. La acetilcolina participa en la regulación de los niveles de vigilancia y en el funcionamiento de grandes áreas de asociación.

Variaciones de sus niveles provocan alteraciones en la conducta y síndromes característicos como: pérdida de memoria y atención, habla confusa, ataxia o desorientación. La alteración en la neurotransmisión colinérgica se considera muy implicada en la EA (por defecto) y en menos medida en la EP (por exceso).

Este neurotransmisor aumenta su acción cuando desciende el nivel del neurotransmisor dopamina, y de hecho, el bloqueo de la acción de la acetilcolina resulta eficaz en el control del temblor y la rigidez que acompañan al enfermo parkinsoniano.

Los fármacos anticolinérgicos, como el **trihexifenidilo**,<sup>5</sup> la **etopropazina** y **prociclidina**,<sup>6</sup> se utilizaron con frecuencia en el pasado en la EP, aunque en la actualidad apenas se usan ya que alteran las habilidades cognitivas de los pacientes.

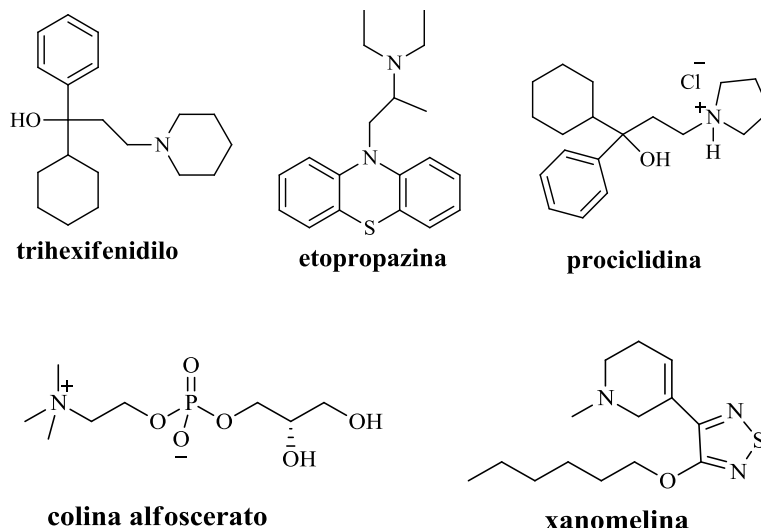
En el caso de la EA se produce una disminución de los niveles de acetilcolina por lo que gran parte de los estudios farmacológicos en el tratamiento de esta enfermedad se han dirigido hacia la búsqueda de fármacos que incrementen los niveles de este neurotransmisor.

<sup>4</sup> Waites, C. L.; Garner, C. C. *Trends in Neurosci.* **2011**, 34 (6), 326.

<sup>5</sup> Giachetti, A.; Giraldo, E.; Ladinsky, H.; Montagna, E. *Br. J. Pharmacol.* **1986**, 89 (1), 83.

<sup>6</sup> Jevtovic-Todorovic A, V.; Meyenburg, A. P.; Olney, J. W.; Wozniak, D. F. *Neuropharmacology* **2003**, 44, 739.

Para ello se pueden usar fármacos que potencien la síntesis de acetilcolina, como la **colina alfoscerato**<sup>7</sup> o agonistas de los receptores muscarínicos y nicotínicos como la **xanomelina**.<sup>8</sup>



También se pueden emplear inhibidores de la *acetilcolinesterasa*, como el **donepezilo**,<sup>9</sup> la **rivastigmina**<sup>10</sup> o la **galantamina**.<sup>11</sup> Estos inhibidores son en la actualidad los fármacos más usados en el tratamiento sintomático de la enfermedad y los que proporcionan los mejores resultados.<sup>12,13</sup> Incrementan la concentración y duración de la acetilcolina en la sinapsis neuronal.

El primer fármaco utilizado en clínica fue la **tacrina**,<sup>14</sup> un inhibidor alostérico reversible que prácticamente se ha dejado de emplear por su efecto hepatotóxico.<sup>15</sup> En la actualidad disponemos de fármacos más seguros como el donepezilo, que es un inhibidor reversible no competitivo mixto, y la rivastigmina, un inhibidor pseudoirreversible no competitivo.<sup>16</sup>

De reciente introducción es la galantamina, un inhibidor reversible competitivo que, a su vez, es un modulador alostérico del receptor nicotínico lo que hace que aumente la liberación de acetilcolina en la sinapsis.<sup>17</sup>

<sup>7</sup> Parnetti, L.; Mignini, F.; Tomassoni, D.; Traini, E.; Amenta, F. *J. Neurol. Sci.* **2007**, 257 (1-2), 264.

<sup>8</sup> Andersen, M. B.; Fink-Jensen, A.; Peacock, L.; Gerlach, J.; Bymaster, F.; Lundbæk, J. A.; Werge, T. *Neuropsychopharmacology* **2003**, 28, 1168.

<sup>9</sup> Bryson, H. M.; Benfield, P. *Drugs Aging* **1997**, 10 (3), 240.

<sup>10</sup> Spencer, C. M.; Noble, S. *Drugs Aging* **1998**, 13 (5), 391.

<sup>11</sup> Fulton, B.; Benfield, P. *Drugs Aging* **1996**, 91 (1), 66.

<sup>12</sup> John, B.; Standridge, M.D. *Clin. Ther.* **2004**, 26 (5), 615.

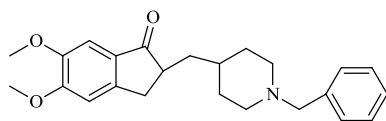
<sup>13</sup> Tasso, B.; Catto, M.; Nicolotti, O.; Novelli, F.; Tonelli, M.; Giangreco, I.; Pisani, L.; Sparatore, A.; Boido, V.; Carotti, A.; Sparatore, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46 (6), 2170.

<sup>14</sup> Samuels, S.C.; Davis, K. L. *Drug Saf.* **1997**, 16 (1), 66.

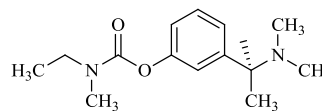
<sup>15</sup> Blackard, W. G. Jr.; Sood, G. K.; Crowe, D. R.; Fallon, M. B. *J. Clin. Gastroenterol.* **1998**, 26 (1), 57.

<sup>16</sup> Jeffrey, L.; Cummings, M.D. *Am. J. Psychiatric* **2000**, 157, 1.

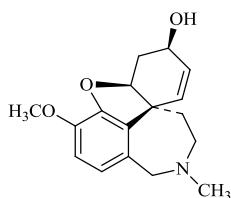
<sup>17</sup> Marco, L.; Carreiras, M. C. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* **2006**, 1 (1), 105.



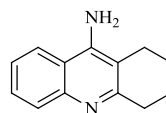
donepezilo



rivastigmina



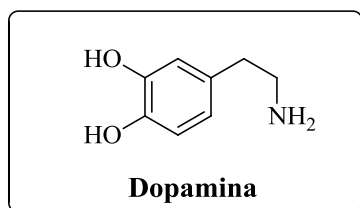
galantamina



tacrina

#### 1.1.2.2. Dopamina

Es una de las tres catecolaminas sintetizadas de forma natural en los mamíferos. Es precursora de la noradrenalina (NA), y fue sintetizada por primera vez en el año 1910 por Barger y Ewins.<sup>18</sup> En un principio se consideró como un intermediario insignificante en la formación de la NA, pero hoy en día, se ha clasificado como el neurotransmisor más importante en el cerebro.



Dopamina

Controla diversas funciones como la actividad locomotora, cognición, emoción, refuerzo positivo, ingesta de alimentos y regulación endocrina.

También desempeña un papel importante en la periferia como modulador de la función cardiovascular, en la liberación de otras catecolaminas, secreción hormonal, tono vascular, función renal y motilidad gastrointestinal.

Así, alteraciones en la regulación de la transmisión dopaminérgica se han relacionado con múltiples desórdenes fisiológicos.<sup>19</sup> El más importante de estos desórdenes es la enfermedad de Parkinson.<sup>20</sup>

Debido a esto, la farmacología mantiene abiertas cuatro líneas de trabajo con un único objetivo, la recuperación de los niveles deficitarios de dopamina. La primera de ellas usa precursores de la síntesis de dopamina, como la **levodopa**,<sup>21</sup> mientras que la segunda emplea potenciadores de su liberación en los botones sinápticos, como la **amantadina**.<sup>22</sup>

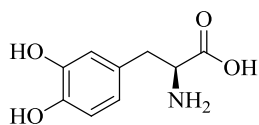
<sup>18</sup> Barger, G.; Ewins, A. J. *J. Chem. Soc.* **1910**, 97, 2253.

<sup>19</sup> Beaulieu, J. M.; Gainetdinov, R. R. *Pharmacol. Rev.* **2011**, 63 (1), 182.

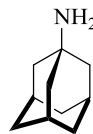
<sup>20</sup> Pifl, C.; Hornykiewicz, O. *Neurochem. Int.* **2006**, 49, 519.

<sup>21</sup> Lev, N.; Djaldetti, R.; Melamed, E. *J. Neurol.* **2007**, 254(Suppl. 5), 19.

<sup>22</sup> Adler, C. H.; Stern, M. B.; Vernon, G.; Hurtig, H. I. *J. Neurol.* **1997**, 244, 336.

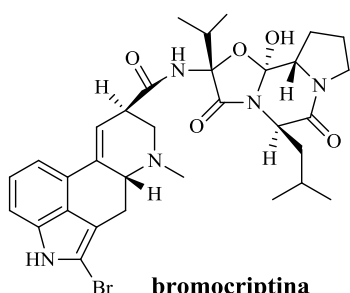


levodopa

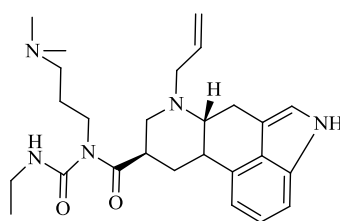


amantadina

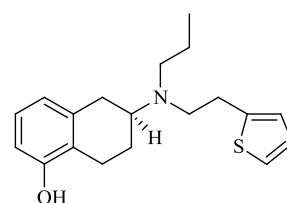
La tercera línea de trabajo se basa en la utilización de agonistas de receptores dopaminérgicos, los cuales se pueden clasificar como derivados del ergot, donde se encuentran la **bromocriptina**, **carbegolina**, la **rotigotina** y la **lisurida**, y los derivados no ergóticos, como la **apomorfina**, el **ropinirol**, y el **pramipexol**.<sup>23</sup>



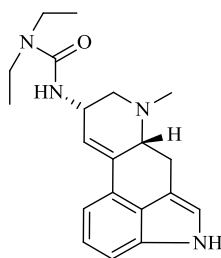
bromocriptina



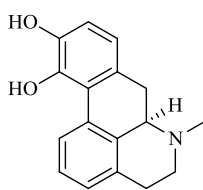
carbegolina



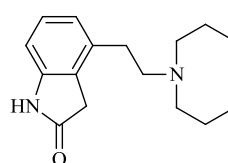
rotigotina



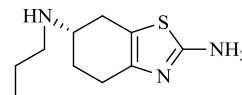
lisurida



apomorfina

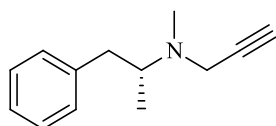


ropinirol

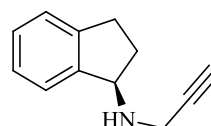


pramipexol

Y por último, tenemos los inhibidores de las enzimas encargadas de su catabolismo, como la *monoamino oxidasa B* (MAO-B). Dentro de estos inhibidores destacan la **selegilina** y la **rasagilina**.<sup>24</sup> Otro enzima que participa en el metabolismo de la dopamina es la *catecol-orto-metil-transferasa* (COMT) y entre los fármacos inhibidores de este enzima encontramos la **entacapona** o la **tolcapona**.<sup>25</sup>



selegilina

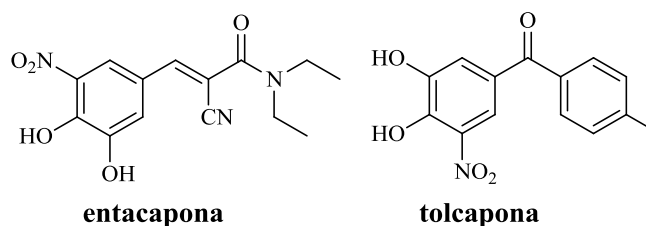


rasagilina

<sup>23</sup> Brooks, D. J. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* **2000**, 68, 685.

<sup>24</sup> Youdim, M. B. H.; Bakhle, Y. S. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147, S287.

<sup>25</sup> Forsberg, M. M.; Huotari, M.; Savolainen, J.; Mannisto P. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, 24, 503.



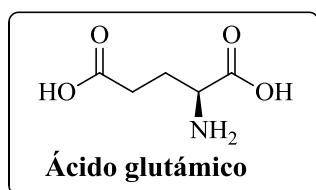
El fármaco más usado y en la actualidad más eficaz para elevar los niveles deficitarios de dopamina es la levodopa, precursor directo de la dopamina en el SNC. Se administra conjuntamente con inhibidores de la *dopadescarboxilasa* (DCC) y de la COMT.<sup>26</sup>

En el caso del clorhidrato de amantadina,<sup>204</sup> se encuentra indicado para el tratamiento como monoterapia o coadyuvante de la levodopa, en estadios iniciales de la enfermedad.

Los agonistas dopaminérgicos estimulan directamente los receptores de dopamina, en algunos casos los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, en otros los D<sub>2</sub> solamente. Tienen las ventajas de su posible empleo en monoterapia o como coadyuvante de la L-dopa, una menor incidencia de fluctuaciones motoras y su posible, aunque no totalmente confirmado, efecto neuroprotector. Sin embargo, presentan efectos adversos comunes a la L-dopa como náuseas, vómitos, hipotensión ortostática, alteraciones neuropsiquiátricas, y algunos específicos sobre todo los compuestos con estructura de derivados ergóticos, como la eritromialgia. Además, no son tan eficaces como la L-dopa.<sup>205</sup>

#### 1.1.2.3. Glutamato

El ácido glutámico, o en su forma ionizada glutamato, es uno de los 20 aminoácidos que forman



parte de las proteínas. Es el neurotransmisor excitatorio por excelencia en el SNC,<sup>27</sup> y sus interacciones con receptores específicos de membrana son responsables de muchas funciones neurológicas, incluyendo los procesos cognitivos y sensitivos, la memoria y el movimiento.

Su papel como neurotransmisor está mediado por la estimulación de receptores específicos, que se clasifican en: ionotrópicos (canales iónicos, como el receptor de *N*-metil-D-aspartato (NMDA), los receptores de Kainato o los receptores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y receptores metabotrópicos (acoplado a proteínas G).<sup>28</sup>

<sup>26</sup> Seeberger, L. C.; Hauser, R. A. *Expert Rev. Neurother.* **2009**, 9 (7), 929.

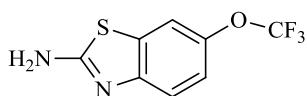
<sup>27</sup> Tanabe, Y.; Nomura, A.; Masu, M.; Shigemoto, R.; Mizuno, N.; Nakanishi, S. *J. Neurosci.* **1993**, 13 (4), 1372.

<sup>28</sup> Hollmann, M.; O'Shea-Greenfield, A.; Rogers, S. W.; Heinemann, S. *Nature* **1989**, 342, 643.

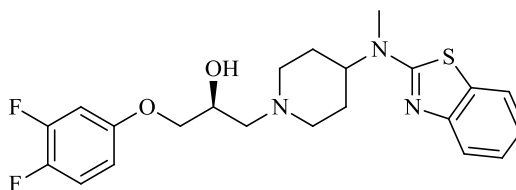
Aunque el glutamato desempeña importantes funciones fisiológicas en el SNC, la activación excesiva de sus receptores, bajo ciertas condiciones, es neurotóxica y se ha relacionado con procesos neurodegenerativos, tanto agudos como crónicos. En la neurotoxicidad aguda, por ejemplo la isquemia cerebral, el déficit energético celular conlleva a una disminución en la recaptación de glutamato del espacio sináptico, con el consecuente aumento en su concentración y un incremento de la sensibilidad de las neuronas al glutamato.<sup>29</sup>

Por otro lado, la neurotoxicidad crónica se media por mecanismos dependientes de la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  y se implica en enfermedades como la ELA, la demencia asociada al SIDA, la EP, la enfermedad de Huntington (EH) y la EA.<sup>30</sup>

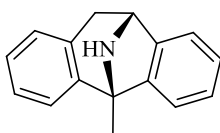
Para paliar esta actividad neurotóxica, la farmacología ha centrado sus estudios en fármacos que o bien disminuyen los niveles sinápticos del neurotransmisor (**riluzol** o **lubeluzol**) o antagonizan los receptores ionotrópicos (**dizocilpina**, **memantina**, y **remacemida**, entre otros).



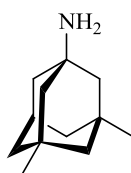
**riluzol**



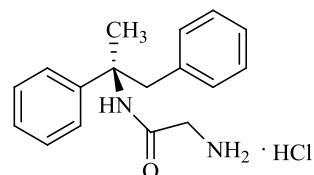
**lubeluzol**



**dizocilpina**



**memantina**



**remacemida**

Aunque el mecanismo exacto de acción del riluzol se desconoce, éste puede ejercer su efecto por la inhibición de los canales de sodio dependientes de voltaje, impidiendo la entrada masiva de  $\text{Ca}^{+2}$  en la neurona presináptica, y disminuyendo la liberación de glutamato.

Tiene propiedades antiisquémicas, sedativas, antiepilépticas y está indicado en el tratamiento de la ELA.<sup>31</sup>

<sup>29</sup> Castillo, J.; Dávalos, A.; Noya, M. *Lancet* **1997**, 349, 79.

<sup>30</sup> Lipton, S. A.; Rosenberg, P.A. *N. Engl. J. Med.* **1994**, 330, 613.

<sup>31</sup> Song, J.; Huang, C.; Nagata, K.; Yeh, J. Z.; Narahashi, T. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, 282 (2), 707.

La dizocilpina es un antagonista no competitivo de los receptores de NMDA y actúa como un potente anticonvulsivante y está siendo estudiado su uso en enfermedades neurodegenerativas.<sup>32</sup>

La memantina es el primero de una nueva clase de medicamentos anti-Alzheimer, y se trata de un antagonista no competitivo de los receptores de NMDA, regulando la entrada de calcio en las neuronas y disminuyendo los niveles de glutamato.

Está indicada para el tratamiento de EA de intensidad moderada a grave.<sup>33</sup> La remacemida es, también, un inhibidor no competitivo del receptor de NMDA y ha sido estudiado en el tratamiento del accidente cerebrovascular y epilepsia.<sup>34</sup>

## 1.2. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson fue descrita por primera vez por James Parkinson<sup>35</sup> en 1817 con el nombre de parálisis agitante. Es un trastorno crónico y progresivo caracterizado por una sintomatología predominantemente motora como bradicinesia, temblor en reposo, rigidez y alteraciones posturales.

Además, aparecen otros síntomas no motores como hipoxia, movimiento rápido de ojos, depresión, desórdenes del sueño y dolor, entre otros muchos,<sup>36</sup> que pueden aparecer incluso antes que los síntomas motores. Afecta al 2% de las personas mayores de 65 años, por lo que en este momento se calcula que en España viven cerca de 150.000 pacientes diagnosticados. Además, se cree que más de 30.000 personas están sin diagnosticar.

Respecto a las perspectivas de futuro, se prevé que el número de afectados se duplique para el año 2025 y llegue a triplicarse en 2050.<sup>37</sup> Se calcula que en todo el mundo existen alrededor de 4 millones de pacientes diagnosticados, situándose como la segunda enfermedad degenerativa más frecuente después del Alzheimer.

La enfermedad cursa con una degeneración neuronal en la sustancia negra, sobre todo en la parte compacta, con la aparición de inclusiones intracelulares llamadas *Cuerpos de Lewy*.

Esto se traduce en una disminución de los niveles de dopamina, cuando estos niveles disminuyen aparecen las alteraciones motrices propias de la enfermedad.<sup>38</sup>

---

<sup>32</sup> Ramoa, A. S.; Alkondon, M.; Aracava, Y.; Irons, J.; Lunt, G. G.; Deshpande, S. S.; Wonnacott, S.; Aronstam, R. S.; Albuquerque, E. X. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 254 (1), 71.

<sup>33</sup> Tampi, R. R.; van Dick, C. H. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2007**, 3(2), 245.

<sup>34</sup> Malek, R.; Borowicz, K. K.; Kimber-Trojnar, Z.; Sobieszek, G.; Piskorska, B.; Czuczwar, S. J. *Pol. J. Pharmacol.* **2003**, 55, 691.

<sup>35</sup> Parkinson, J. *An Essay on the Shaking Palsy*, Sherwood, Neely and Jones. London, 1817

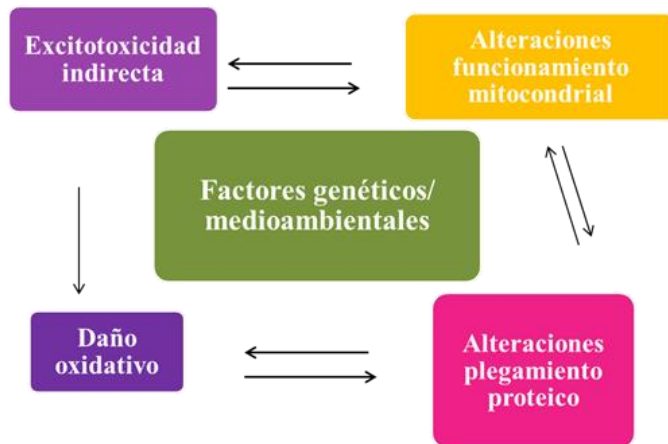
<sup>36</sup> Jankovic, J. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **2008**, 79, 368.

<sup>37</sup> <http://www.fedesparkinson.org>

<sup>38</sup> Arias-Carrión, O. *Arch. Med.* **2007**, 3(4), 1.



Su etiopatología es desconocida y probablemente multifactorial, estando implicados factores



genéticos, ambientales, daño oxidativo, y alteraciones en el plegamiento proteico y en el funcionamiento mitocondrial, lo que deriva en un envejecimiento cerebral acelerado o apoptosis. Los tratamientos existentes son de tipo paliativo.

Actualmente el tratamiento se divide en cuatro categorías:

1. Preventiva o neuroprotectora: interfiere con la causa que origina la muerte neuronal, para intentar evitar o enlentecer la progresión de la enfermedad.
2. Sintomática: su finalidad es restaurar la función dopaminérgica estriatal.
3. Quirúrgica: a través de diferentes técnicas quirúrgicas (lesión o estimulación) se interfiere en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad.
4. Restauradora: esta terapia aporta nuevas células o estimula células normales o enfermas.<sup>39</sup>

### 1.2.1. Tratamiento

Hasta el momento ningún fármaco ha demostrado tener propiedades neuroprotectoras capaces de detener el curso de la enfermedad. Tampoco hay un consenso claro sobre cuál es el mejor fármaco para iniciar el tratamiento ni cuando es el momento preciso para hacerlo. La estrategia terapéutica actualmente vigente, desde el punto de vista farmacológico, se basa principalmente en la potenciación de la actividad dopaminérgica central, ya sea directa (levodopa, agonistas y activadores dopaminérgicos) o indirecta (inhibidores de MAO y de la COMT).

### 1.2.2. Levodopa

Desde la introducción de la levodopa (L-dopa) por Birkmayer y Hornykiewicz en la década de la 60,<sup>40</sup> ésta sigue siendo el pilar central y el fármaco más eficaz para el tratamiento sintomático de la EP.

<sup>39</sup> Lozano, A. M.; Lang, A. E.; Hutchison, W. D.; Dostrovsky, J. O. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1998**, 8 (6), 783.

<sup>40</sup> Birkmayer, W.; Hornykiewicz, O. *Parkinsonism and related disorders* **1998**, 4 (2), 59.

Es un precursor de la dopamina que se absorbe a nivel gastrointestinal y atraviesa la barrera hematoencefálica, a diferencia de la dopamina que no la atraviesa, lo que impide su uso oral para el tratamiento de la EP.

Se administra por vía oral junto con la carbidopa o la benserazida, inhibidores reversibles de la DCC periférica, evitando la degradación de la L-dopa a nivel periférico y aumentando su paso al SNC en un 70%.

Tanto la carbidopa como la benserazida no atraviesan la barrera hematoencefálica por lo que su acción se limita a nivel periférico.

A su vez, la DCC es otro enzima que se encarga de metabolizar la L-dopa, por lo que debemos administrar inhibidores de este enzima como la entacapona con el fin de elevar su vida media.<sup>208</sup>

Mejora sobre todo la bradicinesia y la rigidez, y en menor medida el temblor. Esta mejoría en los síntomas cardinales de la enfermedad se acompaña de mayor capacidad para el desarrollo de habilidades motoras secundarias (expresión facial, escritura, etc.).<sup>41</sup>

### **1.2.3. Amantadina**

Es un antiviral utilizado para el tratamiento de la gripe que presenta también un efecto antiparkinsoniano, aunque por un mecanismo no muy bien conocido.

Puede mejorar la transmisión dopaminérgica, posee algunas propiedades anticolinérgicas y últimamente se ha subrayado su carácter como antagonista NMDA. Suele ser más efectivo que los anticolinérgicos en el control de la bradicinesia y de la rigidez y menos en el control del temblor. Se administra en monoterapia, con anticolinérgicos o con levodopa.<sup>42</sup>

### **1.2.4. Agonistas dopaminérgicos**

El uso de los agonistas dopaminérgicos en el tratamiento de la EP se inició con la introducción de la bromocriptina por Donald Calne y col. en 1974. Inicialmente se utilizaban como terapia complementaria destinada a reducir los efectos motores adversos de la levodopa.

Recientemente, ha ganado terreno su uso en monoterapia para postergar la iniciación del tratamiento con L-dopa, o bien en combinación con dosis bajas de la misma.<sup>43</sup> Los efectos

---

<sup>41</sup> Flórez, J. *Farmacología humana*, Masson, 5ª Ed., **2008**, 609 p.

<sup>42</sup> Crosby, N. J.; Deane, K.; Clarke, C. E. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2003**, *1*, CD003468.

<sup>43</sup> Foley, P.; Gerlach, M.; Double, K. L.; Riederer, P. *J. Neural. Transm.* **2004**, *111*, 1375.

beneficiosos de estos agonistas se basan en su capacidad de producir una estimulación directa y continúa tanto de los receptores dopaminérgicos pre y post-sinápticos.<sup>44</sup>

Como hemos mencionado con anterioridad, estos agonistas se clasifican en derivados ergóticos como la bromocriptina, la lisurida, la carbegolina o la rotigotina y en no ergóticos como la apomorfina, ropinirol o pramipexol.<sup>205</sup>

En la actualidad, se están realizando múltiples estudios sobre la relación existente entre el uso de agonistas ergóticos y la aparición de alteraciones cardíacas, aunque este hecho no está todavía claro, lo que ha generado serias discusiones sobre el uso de estos compuestos.<sup>45</sup>

De hecho, el estudio realizado por Zanettini y col.<sup>46</sup> en el 2007, concluye un significativo riesgo de regurgitación valvular asociado al uso de agonistas ergóticos, sin embargo, este estudio también concluye que es aconsejable un seguimiento ecocardiaco de los pacientes tratados con agonistas dopaminérgicos, en general, es decir ergóticos y no ergóticos.

### 1.2.5. Inhibidores de la MAO-B

#### 1.2.5.1. Introducción

La *monoamino oxidasa* (MAO) es un enzima crucial debido a que cataliza la principal vía de inactivación de los neurotransmisores catecolinérgicos, noradrenalina, adrenalina y dopamina. En 1928, Mary Hare-Bernheim describe un enzima catalizador de la desaminación oxidativa de la tiramina la cual fue denominada como tiramina oxidasa.<sup>47,48</sup>

Unos años después, Hugh Blaschko<sup>49</sup> encontró que la tiramina oxidasa, la noradrenalina oxidasa y la oxidasa de aminas alifáticas era el mismo enzima, capaz de metabolizar aminas primarias, secundarias y terciarias.

Este enzima no metabolizaba diaminas (como la histamina) y por esta razón Zeller la denominó temporalmente como monoamino oxidasa mitocondrial.<sup>50</sup>

El siguiente hecho significativo fue la introducción del primer inhibidor de MAO, **iproniazida**, utilizado en el tratamiento de la depresión. Fue el primer antidepresivo desarrollado y uno de los primeros antipsicóticos utilizados en terapéutica.

---

<sup>44</sup> Radad, K.; Gille, G.; Rausch, W. *Pharmacological Reports* **2005**, 57, 701.

<sup>45</sup> Rasmussen, V. G.; Ostergaard, K.; Dupont, E.; Poulsen, S. H. *Mov. Disord.* **2011**, 25 (5), 801.

<sup>46</sup> Zanettini, R.; Antonini, A.; Gatto, E.; Gentile, R.; Tesei, S.; Pezzoli, G. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 356, 39.

<sup>47</sup> Hare-Bernheim, M. *Biochem. J.* **1928**, 22 (4), 968.

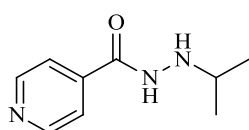
<sup>48</sup> Slotkin, T. A. *Brain Res. Bull.* **1999**, 50 (5-6), 373.

<sup>49</sup> Blaschko, H.; Richter, D.; Schlossmann, H. *Biochem. J.* **1937**, 31, 2187.

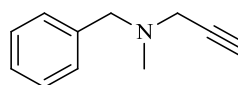
<sup>50</sup> Domino, E. F. *Schizophrenia Bull.* **1980**, 6 (2), 292.

En los años 50 y 60 la iproniazida y otros inhibidores de la MAO mostraron una marcada actividad antidepresiva pero su uso se vio comprometido debido a sus efectos secundarios y a la introducción de los antidepresivos tricíclicos en terapéutica.<sup>51</sup>

Durante este período se estableció que la MAO estaba localizada en la membrana mitocondrial externa y que se trataba de una flavoproteína, con el FAD como cofactor. Mucho más tarde, este cofactor fue identificado como el sitio al cual los inhibidores irreversibles de la MAO, como **pargilina** o rasagilina, se unen covalentemente.<sup>206</sup>

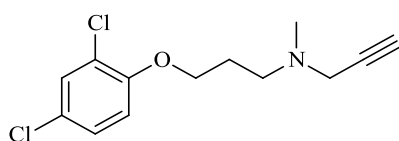


**iproniazida**

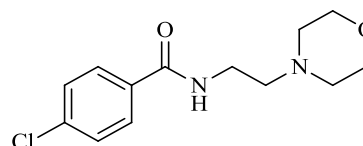


**pargilina**

En la actualidad se sabe que la MAO (E.C.1.4.3.4) es una flavoenzima importante en la desaminación oxidativa de una variedad de aminas biógenas y de aminas derivadas de la dieta tanto en el sistema nervioso central como en los tejidos periféricos.<sup>52</sup> Dos isoformas están totalmente caracterizadas, la MAO-A y la MAO-B, de acuerdo con su especificidad de sustrato, sensibilidad a inhibidores y secuencia de aminoácidos.<sup>53</sup> La isoenzima A metaboliza preferentemente serotonina y es inhibida por la **clorgilina** y la **moclobemida**, y la isoenzima B metaboliza feniletilamina y bencilamina, y es inhibida por la selegilina y la rasagilina.<sup>54</sup>



**clorgilina**



**moclobemida**

Binda y cols.<sup>55,56</sup> describen la estructura cristalina de estos dos isoenzimas (MAO-A, 2BXR, 2BXS, 2BYB, MAO-B, 1GOS) destacando la interacción selectiva de éstas con sus ligandos (**Figura 4**).

<sup>51</sup> Wells, D. G.; Bjorksten, A. R. *Can. J. Anaesth.* **1989**, 36 (1), 64

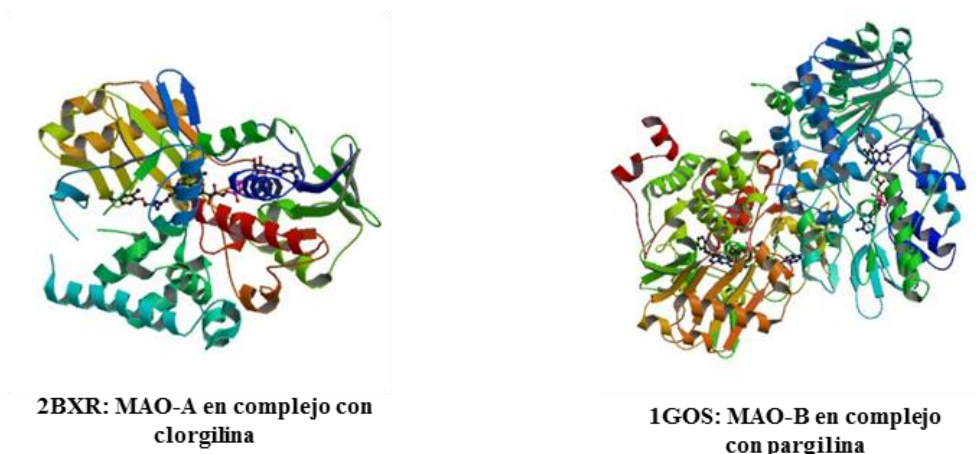
<sup>52</sup> Tropakçi, M.; Yelekçi, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 4438.

<sup>53</sup> Chimenti, F.; Fioravanti, R.; Bolasco, A.; Chimenti, P.; Secci, D.; Rossi, F.; Yañez, M.; Orallo, F.; Ortuso, F.; Alcaro, S. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 2818.

<sup>54</sup> Chimenti, F.; Fioravanti, R.; Bolasco, A.; Manna, F.; Chimenti, D.; Secci, P.; Rossi, F.; Turini, P.; Ortuso, F.; Alcaro, S.; Cardia, M. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 2262.

<sup>55</sup> Binda, C.; Newton-Vinson, P.; Hubálek, F.; Edmonson, D. E.; Mattevi, A. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9 (1), 22.

<sup>56</sup> De Colibus, L.; Li, M.; Binda, C.; Lustig, A.; Edmonson, D. E.; Mattevi, A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102, 12684.

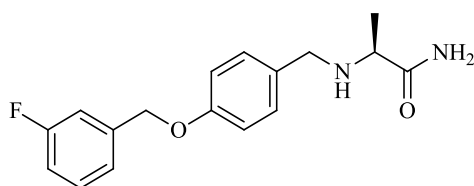


**Figura 4**

Los inhibidores de la isoforma A se utilizan como antidepresivos y ansiolíticos, mientras que los de la isoforma B son utilizados en el tratamiento de EP y EA.

En los últimos años, ha crecido el interés por el desarrollo de nuevos inhibidores de MAO-B debido al descubrimiento de la existencia de una relación entre la edad y un aumento en la expresión de MAO-B a partir de los 60 años, especialmente en la células de la glía,<sup>57,58</sup> así como al descubrimiento de que estos inhibidores tienen efectos neuroprotectores y antioxidantes, y juegan un papel importante en el retraso de la muerte neuronal por apoptosis.<sup>59,60</sup>

Como ya hemos mencionado con anterioridad, los inhibidores de MAO-B utilizados en clínica son la selegilina y la rasagilina, y en 2006, un nuevo inhibidor de este enzima, **safinamida** ha entrado en fase III de desarrollo clínico.<sup>61</sup>



**safinamida**

<sup>57</sup> Shih, J. C.; Chen, K.; Ridd, M. J. *Annu. Rev. Neurosci.* **1999**, *22*, 197.

<sup>58</sup> Sayre, L. M.; Perry, G.; Smith, M. A. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 172.

<sup>59</sup> Youdim, M. B. H.; Fridkin, M.; Zheng, H. *J. Neural. Transm.* **2004**, *111*, 1455.

<sup>60</sup> Herraiz, T.; Guillen, H. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49* (8), 1773.

<sup>61</sup> Caccia, C.; Maj, R.; Calabresi, M.; Maestroni, S.; Faravelli, L.; Curatolo, L.; Salvati, P.; Fariello, R. G. *Neurology* **2006**, *6* (7), S18.

#### 1.2.5.2. Selegilina

La selegilina, L-deprenil, surgió como resultado de las investigaciones llevadas a cabo por Knoll y Magyar<sup>62</sup> en el campo de los IMAOs. Es un derivado de propargilamina que inhibe selectivamente la MAO-B.

Este compuesto, a dosis bajas, inhibe la desaminación oxidativa de la dopamina, feniletilamina y bencilamina pero no la de la noradrenalina o serotonina. Sin embargo, a dosis más altas, la selectividad se pierde.

Inicialmente, se evaluó como antidepresivo pero sin demasiado éxito. Fueron Peter Riederer y Walther Birkmayer los que plantearon el posible uso de la selegilina en el tratamiento de la EP.<sup>63</sup>

Finalmente, la FDA aprobó su comercialización en 1989 para el tratamiento de la EP, y en febrero de 2006 también fue aprobado su uso en el tratamiento de la depresión mayor mediante un parche transdérmico (Emsam).<sup>64,65</sup>

Utilizada en monoterapia proporciona una eficacia sintomática moderada, sin embargo no hay pruebas concluyentes de que este fármaco administrado en etapas tempranas retrase de forma significativa la evolución de la enfermedad.<sup>66</sup> Cuando se administra conjuntamente con L-dopa, disminuye la cantidad necesaria de esta última pero tampoco retrasa la progresión de la enfermedad ni previene las discinesias a largo plazo. No existe una evidencia clara de que este fármaco presente un efecto neuroprotector.

Además, la selegilina presenta una serie de efectos secundarios debido a los metabolitos anfetamínicos que genera.

#### 1.2.5.3. Rasagilina

En 1978, **AGN 1133**, una nueva serie de inhibidores de MAO derivados del aminoindano, fueron desarrollados inicialmente como antihipertensivos para posteriormente descubrir que eran potentes pero no selectivos inhibidores irreversibles de la MAO. Tras esto, se descubrió, que su derivado *N*-desmetilado **AGN 1135**, era un potente y selectivo inhibidor de la isoforma B de la MAO.<sup>67</sup>

---

<sup>62</sup> Knoll, J.; Magyar, K. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **1972**, 5, 393.

<sup>63</sup> Birkmayer, W.; Riederer, P.; Youdim, M. B. H.; Linauer, W. *J. Neural Transm.* **1975**, 36, 303.

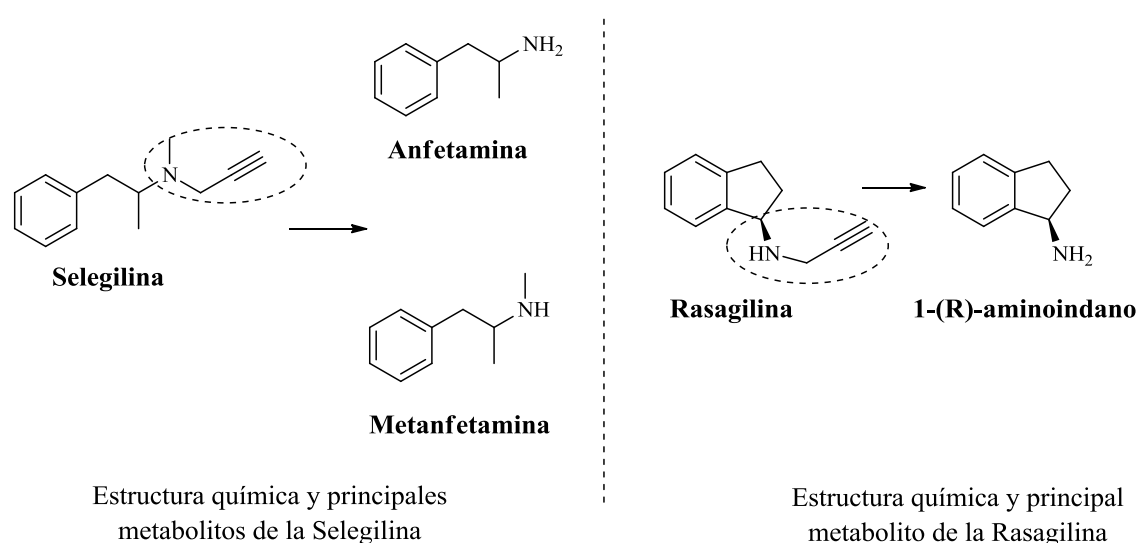
<sup>64</sup> FDA Approves Emsam (Selegiline) as First Drug Patch for Depression

<sup>65</sup> Patkar, A. A.; Pae, C.; Masand, P.S. *CNS Spectr.* **2006**, 11, 363.

<sup>66</sup> Weinreb, O.; Amit, T.; Bar-Am, O.; Youdim, M. B. H. *Prog. Neurobiol.* **2010**, 92 (3), 330.

<sup>67</sup> Finberg, J. P.; Tenne, M.; Youdim, M. B. H. *Br. J. Pharmacol.* **1981**, 73, 13.

Este hecho renovó el interés por esta segunda generación de inhibidores, estructuralmente relacionados con la selegilina, pero más potentes y que no se metabolizan a derivados anfetamínicos con lo cual carecen de la actividad simpaticomimética y de los efectos secundarios propios de la selegilina.<sup>68</sup> Debido a que el aminoindano pueda presentarse como dos isómeros, al enantiómero R (+) del AGN 1135 se le denominó rasagilina. Este enantiómero es del orden de 4 veces más potente que su isómero S en cuanto a inhibición de MAO-B (**Figura 5**).<sup>69</sup>



**Figura 5**

La rasagilina (Azilect®, *N*-propargil-1-(R)-aminoindano) es un potente inhibidor selectivo e irreversible de la MAO-B, aprobado por la FDA en mayo de 2006, como monoterapia en estadios iniciales de la EP y como coadyuvante la L-dopa en estadios más avanzados. Surgió como resultado de la búsqueda para crear un inhibidor de la MAO-B carente de los efectos secundarios propios de la selegilina.<sup>70</sup>

Esta inhibición irreversible y selectiva previene la degradación de la dopamina, reduciendo las fluctuaciones motoras y exhibiendo una mayor eficacia con respecto a la terapia basada en agonistas dopaminérgicos.

Se tolera mejor y en contraste con otros anti-parkinsonianos se puede administrar una vez al día sin necesidad de ajuste de dosis. Es del orden de 5-10 veces más potente que la

<sup>68</sup> Blandini, F. *CNS Drug Rev.* **2005**, *11*, 183.

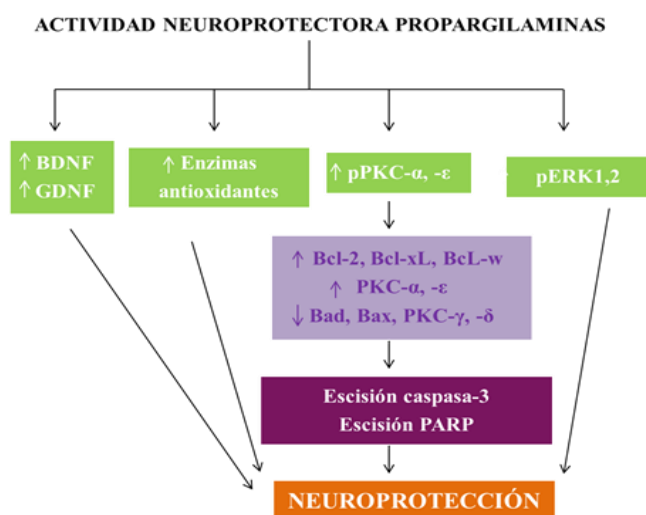
<sup>69</sup> Youdim, M. B. H.; Gross, A.; Finberg, J. P. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 500.

<sup>70</sup> Schapira, A. H. V *Arch. Neurol.* **2007**, *64* (8), 1083.

selegilina.<sup>71</sup> Además, la rasagilina presenta actividad neuroprotectora debido a un efecto antiapoptótico, siendo éste un tipo de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas,<sup>72</sup> que es superior a la presentada por la selegilina.

Esta actividad neuroprotectora se pudo demostrar a través de diversos ensayos clínicos realizados en pacientes que iniciaron el tratamiento en estadios iniciales de la enfermedad experimentando un menor declive funcional, con respecto a pacientes que retrasaron el inicio del tratamiento 6 meses. Para poder percibir este efecto es necesario esperar como mínimo un año, pudiendo observarlo también en períodos más largos de tratamiento (5-6 años). Estos hallazgos apoyan la afirmación de que los beneficios clínicos de la rasagilina, no son sólo sintomáticos sino que también reflejan una actividad neuroprotectora.<sup>206</sup>

El mecanismo de este efecto se ha relacionado con la activación de las vías anti-apoptóticas que



**Figura 6**

implican la prevención del colapso del potencial de membrana mitocondrial mediante la activación de la subfamilia antiapoptótica Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xl y Bcl-w), y la regulación a la baja de las subfamilias proapoptóticas Bad y Bax, a nivel de la mitocondria.<sup>205</sup> Esta regulación es dependiente de la activación de PKC-α y -ε, mientras que las PKC-δ y -γ son reguladas a la baja. Además eleva la expresión de factores neurotróficos (GDNF y BDNF) y enzimas

antioxidantes e incrementa las fosforilación de las quinasas extracelulares de señal regulada (KER) (**Figura 6**). En definitiva, ejerce un efecto multifuncional actuando sobre numerosos mecanismos implicados en la muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas.

Por otro lado, el metabolito principal de la rasagilina, aminoindano, tiene actividad anti-parkinsoniana per se. Estudios recientes han demostrado el potencial efecto antiapoptótico de este compuesto lo que sugiere que puede contribuir al efecto neuroprotector y antiapoptótico total que presenta la rasagilina.<sup>73</sup>

<sup>71</sup> Rascol, O.; Brooks, D. J.; Melamed, E.; Oertel, W.; Poewe, W.; Stocchi, F.; Tolosa, E. *Lancet*, **2005**, 365, 947.

<sup>72</sup> Ahlskog, J. E.; Uitti, R. J. *Neurology* **2010**, 74 (14), 1143.

<sup>73</sup> Bar-Am, O.; Weinreb, O.; Amit, T.; Youdim, M. B. H. *J. Neurochem.* **2010**, 112, 1131.

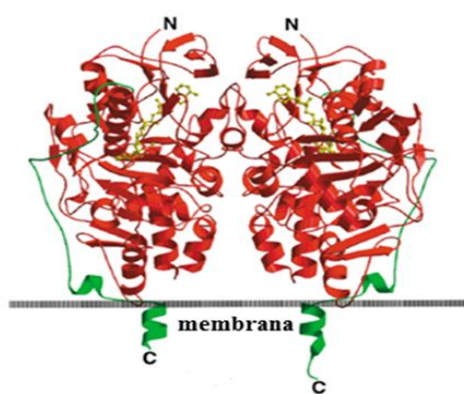


Se ha sugerido que la rasagilina podría ser el primer tratamiento frente a la EP que ha recibido el calificativo de modificador de la enfermedad por la FDA, en base a los prometedores resultados obtenidos con pacientes en estadios iniciales y avanzados de la enfermedad,<sup>74,75</sup> así como por los recientes resultados obtenidos en el estudio clínico en fase III ADAGIO (Attenuation of Disease progression with Azilect Given Once Daily).<sup>76</sup>

Estudios de relación estructura-actividad demostraron que el radical propargilo es esencial para esta neuroprotección. También, se sabe que el isómero S de la rasagilina, TVP 1022, es neuroprotector pero no inhibe, o inhibe débilmente la MAO, lo que indica que la actividad inhibitoria sobre este enzima no es un requisito para el efecto antiapoptótico. Se concluye entonces que la estructura de *N*-propargil-1-aminoindano es necesaria para la neuroprotección.<sup>77</sup>

#### 1.2.5.4. Unión de la rasagilina al enzima

La estructura cristalina del enzima muestra que es un dímero y que está unido a la superficie mitocondrial externa a través de un segmento polipeptídico C-terminal transmembrana (**Figura 7**).<sup>237</sup>



**Figura 7**

En la figura podemos observar el monómero *A* a la izquierda y el monómero *B* a la derecha. Las letras “N” y “C” indican los extremos N-terminal y C-terminal respectivamente.

El dímero está anclado a la membrana mitocondrial externa a través del extremo C-terminal, en verde. El sitio de unión del sustrato está formado por una cavidad plana de 420 Å<sup>3</sup>, denominada “cavidad sustrato”. Adyacente a esta cavidad sustrato se sitúa

una cavidad pequeña e hidrofóbica, con un volumen de 290 Å<sup>3</sup>.

Esta segunda cavidad está situada entre el sitio activo y la superficie de la proteína y está protegida del solvente por lo que se denomina loop 99-112. Son los residuos de Tyr 326, Ile 199, Leu 171 y Phe 168 los que separan las dos cavidades.

Estas observaciones sugieren un mecanismo de admisión de sustratos dentro del sitio activo que inicialmente implica el movimiento del loop 99-112, para abrir el acceso a esta pequeña

<sup>74</sup> Parkinson Study Group *Arch. Neurol.* **2002**, 59, 1937.

<sup>75</sup> Parkinson Study Group *Arch. Neurol.* **2005**, 62, 241.

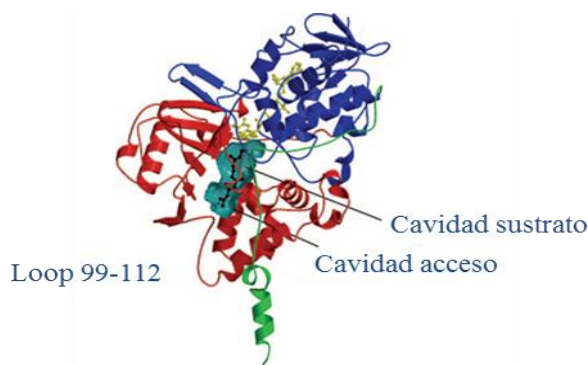
<sup>76</sup> Jenner, P.; Lagston, J. W. *Mov. Disord.* **2011**, doi: 10.1002/mds.23926.

<sup>77</sup> Mandel, S.; Weinreb, O.; Amit, T.; Youdim, M. B. H. *Brain Res. Rev.* **2005**, 48, 379.

cavidad, denominada también “cavidad acceso”. Después de que los sustratos alcancen esta cavidad, un movimiento transitorio de los cuatro residuos que separan las dos cavidades debe ocurrir para permitir su difusión al sitio activo.

Concretamente, el residuo de Ile 199 actúa como residuo “puerta” entre estas dos cavidades, ya que puede existir en dos conformaciones diferentes, una conformación cerrada separando la cavidad sustrato de la cavidad acceso, y una conformación abierta fusionando las dos cavidades.<sup>78</sup>

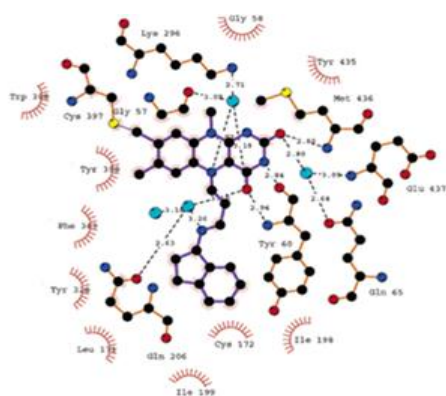
En la representación esquemática de uno de los monómeros de la MAO-B en complejo con el *trans,trans*-farsenol, vemos en azul el dominio de unión del FAD, en rojo el dominio del sustrato y



**Figura 8**

en verde la región C-terminal que se une a la membrana. El cofactor FAD y el inhibidor se muestran en color amarillo y la cavidad de unión del inhibidor se muestra mediante una superficie semitransparente verdosa (**Figura 8**).

Se ha demostrado que la rasagilina ocupa el espacio de la cavidad sustrato con el anillo de aminoindano lo suficientemente extendido como para hacer que la Ile 199 adopte su



**Figura 9**

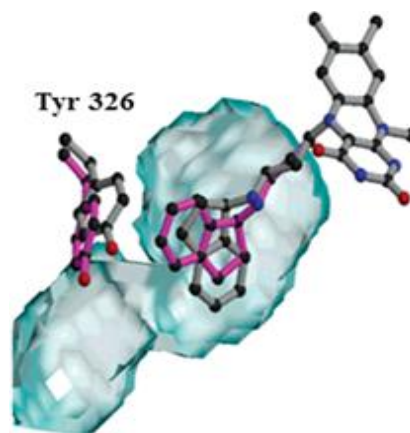
conformación abierta. La unión de la rasagilina con el enzima implica una serie de interacciones de Van der Waals con algunos de los aminoácidos presentes en la cavidad. El anillo de indano de la rasagilina se sitúa perpendicular a la cara *re* del FAD y la fracción aromática interacciona con las cadenas laterales de determinados residuos claves como Tyr 398, Tyr 435 y Tyr 188. El grupo propargilo se alinea con el átomo de N5 del FAD, uniéndose a éste de forma covalente y el átomo de N10 de la

rasagilina establece el único puente de hidrógeno con una de las cuatro moléculas de agua presentes en la cavidad.

<sup>78</sup> Hubálek, F.; Binda, C.; Khalil, A.; Li, M.; Mattevi, A.; Castagnoli, N.; Edmondson, D. E. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (16), 15761.

Todas estas interacciones se establecen, prácticamente por la misma cara de la molécula. El residuo «puerta» Ile 199 está en contacto con el C4 del inhibidor, el cual da hacia el poro que conecta la cavidad de acceso con la cavidad sustrato (**Figura 9**).<sup>234</sup>

El isómero S de la rasagilina, TVP 1022, difiere de ésta en la quiralidad del C9, la cual provoca un cambio dramático en el modo de unión del anillo de indano, que debe girar 180° con respecto a la conformación observada en el complejo de rasagilina. La superposición del isómero S con la rasagilina muestra que los anillos son exactamente coplanares (pero en direcciones opuestas). El cambio en la orientación del anillo se asocia con un movimiento del residuo Tyr 326, un aminoácido que forma el techo de la cavidad. Además de este cambio en la conformación, el sitio activo del complejo del TVP 1022 sigue siendo indistinguible del que aparece en el complejo de rasagilina (**Figura 10**).<sup>79</sup> En la imagen podemos ver la comparativa de los dos modos de unión de la rasagilina y su isómero S. En color gris



**Figura 10**

aparece el complejo formado por la rasagilina, anillo de flavina, inhibidor y residuo de Tyr 326, mientras que en magenta aparece el complejo formado por TVP 1022, el inhibidor y el residuo de Tyr 326. La cavidad de unión del inhibidor aparece nuevamente representada como una superficie semitransparente verdosa. Esto podría explicar su baja potencia inhibitoria sobre MAO-B, independientemente de la unión covalente o no, o la presencia de sustituyentes o no.

Los actuales enfoques terapéuticos sugieren que los fármacos que actúan como un único target pueden ser insuficientes para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas multifactoriales como EP, EA, Enfermedad de Huntington y ELA, todas ellas caracterizadas por la coexistencia de múltiples etiopatologías. Estas incluyen, entre otros, estrés oxidativo y formación de especies reactivas de oxígeno, plegamiento y agregación proteica, disfunción mitocondrial, inflamación, acumulación de metales en sitios de neurodegeneración, etc.<sup>80</sup>

Hasta el momento, este tipo de desórdenes se trata con la combinación de varios fármacos, lo cual presenta como principal factor de riesgo el incumplimiento de la medicación.

<sup>79</sup> Binda, C.; Hubálek, F.; Li, M.; Herzig, Y.; Sterling, J.; Edmondson, E.; Mattevi, A. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1767.

<sup>80</sup> Weinreb, O.; Mandel, S.; Bar-Am, O.; Yogev-Falach, M.; Avramovich-Tirosh, Y.; Amit, T.; Youdim, M. B. H. *Neurother.* **2009**, 6, 163.

Además presentan otro tipo de problemas como las reacciones adversas de los fármacos, las interacciones fármaco-fármaco, un número elevado de píldoras diarias, así como un alto coste para la sociedad.<sup>81</sup> Por todo ello, es poco probable que una única acción farmacológica proporcione una solución satisfactoria y completa a este tipo de pacientes.

Para lograr esto, y evitar los problemas mencionados previamente, se hace necesario el uso de compuestos que incorporen en una misma molécula varias acciones farmacológicas, y que trabajen de forma sinérgica, es decir, será necesario el uso de fármacos de acción dual.<sup>82</sup>

### 1.3. FÁRMACOS DE ACCIÓN DUAL

Un fármaco de acción dual es un compuesto híbrido que contiene dos (o más) dominios estructurales con diferentes funciones biológicas, es decir, contiene dos (o más) farmacóforos distintos combinados en una misma molécula. Por lo tanto, el uso de estos fármacos conduce a resultados más eficaces ya que disminuye el número de pastillas diarias, facilita el cumplimiento de la medicación, reduce los efectos adversos o las interacciones fármaco-fármaco.<sup>263</sup>

Entre estos fármacos de acción dual se encuentran los inhibidores duales (contiene en una única molécula una actividad inhibitoria dual), los cuales en la actualidad están ganando importancia tanto en el ámbito científico como clínico.

Algunos ejemplos de inhibidores duales son la **rivastigmina** (anti-Alzheimer, inhibe la *acetil y butirilcolinesterasa*),<sup>83</sup> **ladostigilo** (en fase III de desarrollo para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, inhibe la *acetilcolinesterasa* y la MAO-B),<sup>84</sup> **M30** ( en fase de desarrollo para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, es un agente quelante del hierro y un inhibidor de la MAO-B),<sup>85</sup> **asenapina** (antipsicótico, actúa sobre receptores serotoninérgicos, dopaminérgicos, y adrenérgicos),<sup>86</sup> **fenserina** (anti-Alzheimer, inhibe la *acetil y butirilcolinesterasa*),<sup>87</sup> **amitriptilina** (antidepresivo tricíclico, actúa sobre receptores de serotonina y noradrenalina)<sup>88</sup> y safinamida (en fase III de desarrollo como potencial tratamiento para EP y epilepsia, es un inhibidor de MAO-B y de la recaptación de dopamina).<sup>89</sup>

---

<sup>81</sup> Patyar, S.; Prakash, A.; Medhi, B. *J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, 63, 459.

<sup>82</sup> Sterling, J.; Herzig, Y.; Goren, T.; Finkelstein, N.; Lerner, D.; Goldenberg, W.; Miskolczi, I.; Molnar, S.; Rantal, F.; Tamas, T.; Toth, G.; Zagyva, A.; Zekany, A.; Lavian, G.; Gross, A.; Friedman, R.; Razin, M.; Huang, W.; Krais, B.; Chorev, M.; Youdim, M. B. H.; Weinstock, M. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5260.

<sup>83</sup> Giacobini, E.; Spiegel, R.; Enz, A.; Veroff, A. E.; Cutler, N. R. *J. Neural. Transm.* **2002**, 109, 1053.

<sup>84</sup> Weinstock, M.; Bejar, C.; Wang, R. H.; Poltyrev, T.; Gross, A.; Finberg, J. P.; Youdim, M. B. H. *J. Neural. Transm.* **2000**, 60, 157.

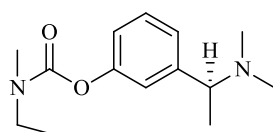
<sup>85</sup> Mechlovich, D.; Amit, T.; Mandel, S. A.; Bar-Am, O.; Bloch, K.; Vardi, P.; Youdim, M. B. H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, 333 (3), 874.

<sup>86</sup> Weber, J.; McCormack, P. L. *CNS Drugs* **2009**, 23 (9), 781.

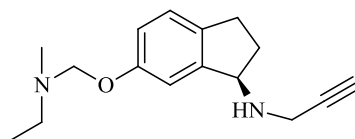
<sup>87</sup> Klein, J. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2007**, 16 (7), 1087.

<sup>88</sup> Guaiana, G.; Barbui, C.; Hotopf, M. *Cochrane Databases Syst. Rev.* **2007**, 18 (3), CD004186.

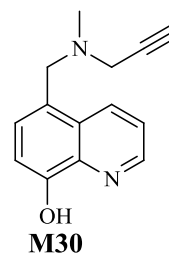
<sup>89</sup> [www.safinamide.com](http://www.safinamide.com)



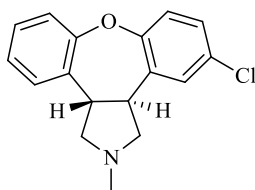
**rivastigmina**



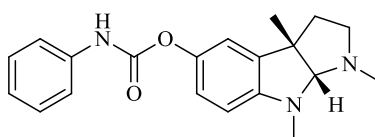
**ladostigilo**



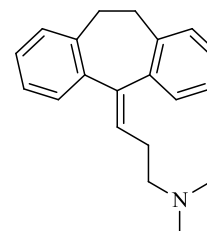
**M30**



**asenapina**



**fenserina**



**amitriptilina**

Por todo esto, el uso de fármacos de acción dual se ha convertido en una nueva y prometedora estrategia terapéutica en el tratamiento de estas enfermedades, de entre las que destaca la EA, ya que es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente, habiendo en España alrededor de 600.000 pacientes diagnosticados.

#### 1.4. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Hace más de 100 años, Alois Alzheimer fue el primero en describir las características clínicas y patológicas de una enfermedad cerebral poco común en aquel momento.<sup>90</sup> En 1910 Emil Kraepelin la denominó como Enfermedad de Alzheimer,<sup>91</sup> siendo en la actualidad la enfermedad neurodegenerativa más frecuente, con más de 8 millones de pacientes diagnosticados en el mundo, lo cual representa un problema grave desde el punto de vista social y económico.

Se estima que en total existen 36 millones de pacientes, de los cuales 28 millones todavía no han recibido un diagnóstico y por lo tanto no pueden acceder al tratamiento, a la información y a los cuidados.<sup>92</sup> Se caracteriza por el deterioro funcional y la pérdida progresiva de neuronas, traducándose en una disminución gradual de la memoria y de otras funciones cognitivas, lo que lleva a la demencia.<sup>93</sup>

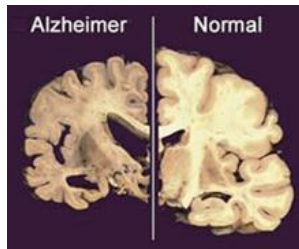
<sup>90</sup> Alzheimer, A. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* **1907**, 64, 146.

<sup>91</sup> Kraepelin, E. *Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. Verlag von Johann Ambrosius Barth, Leipzig, **1910**, p. 593-632.

<sup>92</sup> Alzheimer Disease International, [www.alz.co.uk](http://www.alz.co.uk).

<sup>93</sup> Gotz, J.; Ittner, A.; Ittner, L. M. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, 165 (5), 1246.

Por lo general, el síntoma inicial de la enfermedad es la incapacidad de memorizar cosas nuevas. A medida que progresa la enfermedad, aparecen confusión, irritabilidad mental y agresión, cambios de humor, trastornos del lenguaje, pérdida de la memoria de largo plazo y una predisposición a aislarse a medida que los síntomas del paciente se van acentuando. Gradualmente se pierden las funciones biológicas que finalmente conllevan a la muerte.<sup>94</sup>



Anatómicamente, existen diferencias notables entre un cerebro normal y el de un paciente con EA. El volumen del cerebro se reduce por la muerte de células nerviosas, las hendiduras y surcos se hacen más notorios y las células que subsisten pierden la capacidad de reaccionar a los estímulos nerviosos.

Podemos clasificar la enfermedad en tres niveles:<sup>95</sup>

- ✓ Leve: se caracteriza por un deterioro de la atención y la memoria, olvido de información reciente, confusión y/o desorientación ocasional, y problemas para desarrollar actividades cotidianas.
- ✓ Moderada: caracterizada por amnesia para los acontecimientos recientes, desorientación de tiempo y lugar, deterioro del razonamiento y la capacidad para entender los acontecimientos, dando como resultado la dependencia de otras personas para llevar a cabo el cuidado personal y la realización de las tareas diarias.
- ✓ Severa: se define por el habla incoherente, desorientación en tiempo, lugar y persona, incapacidad para reconocer parientes cercanos, incontinencia, lo que se traduce en una total dependencia de los demás para desarrollar las actividades diarias.

A día de hoy, las causas de la enfermedad todavía no han sido completamente descubiertas. Existen tres principales hipótesis: el déficit de acetilcolina, la acumulación de amiloide y/o tau, y los trastornos metabólicos.

#### 1.4.1 Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica, propuesta por primera vez por Davies and Maloney en 1976, fue la primera teoría planteada para tratar de explicar la enfermedad de Alzheimer, y desde entonces se han desarrollado fármacos anticolinérgicos que están sólo indicados para el tratamiento de la enfermedad en un estadio leve a moderado.<sup>96</sup> La teoría se basa en la observación de que en los

<sup>94</sup> Understanding stages and symptoms of Alzheimer's disease. National Institute on Aging. October 26, 2007. <http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/stages.htm>

<sup>95</sup> Birks, J.; Harvey, R. J. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2006**, 25 (1), CD001190.

<sup>96</sup> Craig, L. A.; Hong, N. S.; McDonald R. J. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2011**, 35, 1397.

cerebros de pacientes con EA se produce un déficit en la transmisión colinérgica central debido a una degeneración de los núcleos cerebrales basales anteriores, lo cual es una importante característica patológica y neuroquímica.

Una progresiva pérdida de receptores nicotínicos a lo largo del curso de la enfermedad también ha sido descrita, y se ha puesto de manifiesto el papel que juegan estos receptores en los déficits de memoria y aprendizaje.

Esta hipótesis no ha mantenido un apoyo global debido a que los medicamentos que tratan la deficiencia colinérgica tienen reducida efectividad en la prevención o cura del Alzheimer.

A pesar de todo esto, el tratamiento con estos inhibidores se ha establecido como la primera línea de tratamiento en pacientes con EA de leve a moderada.<sup>97</sup>

Para mejorar la neurotransmisión colinérgica, como ya hemos mencionado anteriormente, se pueden utilizar fármacos que potencien la síntesis de acetilcolina, agonistas de receptores muscarínicos y nicotínicos o inhibidores de la *acetilcolinesterasa*.<sup>98</sup>

Los datos actuales no apoyan el uso de los dos primeros grupos debido a su falta de eficacia y a sus efectos secundarios.

#### 1.4.1.1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa

Los inhibidores de *acetilcolinesterasa* (IACHes) tienen efectos beneficiosos sobre síntomas cognitivos, funcionales y de comportamiento. Cuatro inhibidores colinérgicos están aprobados para el tratamiento de EA de intensidad leve a moderada por la FDA, tacrina (1993), donepezilo (1998), rivastigmina (2000) y galantamina (2001).

Los tres primeros inhiben selectivamente la *acetilcolinesterasa*, mientras que la galantamina actúa como un ligando alostérico de receptores nicotínicos de acetilcolina, aumentando la liberación pre y post-sináptica de la misma, mejorando la transmisión colinérgica.<sup>199</sup>

Como ya hemos mencionado con anterioridad, la tacrina prácticamente se ha dejado de utilizar debido a su efecto hepatotóxico.<sup>196,197</sup>

Aunque donepezilo, rivastigmina y galantamina pertenecen al mismo grupo terapéutico, difieren en su farmacología y propiedades farmacocinéticas. El donepezilo es un inhibidor de la *acetilcolinesterasa* no competitivo y reversible, derivado de piperidina. Tiene una vida media

---

<sup>97</sup> Terry, A. V.; Buccafusco, J. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 306 (3), 821.

<sup>98</sup> Dumas, J. A.; Newhouse, P. A. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2011**, 99 (2), 254.

larga y se administra una vez al día. La rivastigmina es un inhibidor pseudoirreversible tanto de la *acetil* como de la *butirilcolinesterasa*. Tiene una vida media corta, por lo que son necesarias dos administraciones diarias.

La galantamina es un inhibidor selectivo y reversible de la *acetilcolinesterasa* y es un modulador alostérico positivo de los receptores nicotínicos. Son necesarias dos administraciones diarias.<sup>99</sup>

El tratamiento de la EA con inhibidores de la *acetilcolinesterasa* es solo paliativo o sintomático ya que estos fármacos no actúan sobre los mecanismos patogénicos de la enfermedad. El efecto terapéutico más común de estos fármacos es el retraso de la progresión de los síntomas clínicos respecto al deterioro previsto.

#### 1.4.1.2. Memantina

El quinto fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de EA es la memantina, el cual es el único que está indicado para el tratamiento de la enfermedad en estadio moderado a severo.<sup>100</sup>

Como ya hemos relatado anteriormente, el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC y cuya función se desarrolla en la neurotransmisión y la plasticidad. Los receptores glutamato están divididos en *N*-metil-D-aspartato (NMDA), los de  $\alpha$ -3-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los receptores de Kainato.

El receptor de NMDA tiene una compleja estructura con varios sitios de unión para el NMDA y el glutamato y un canal iónico central capaz de unir fenciclidina. La activación de los receptores de NMDA está implicada en la potenciación a largo plazo, la cual es el mecanismo neuronal responsable de la memoria y el aprendizaje.<sup>281</sup>

En situaciones de patogénesis, como la neurodegeneración en EA, se cree que un incremento del glutamato extracelular lleva a una acumulación de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, lo cual inicia una cascada de eventos que lleva a la muerte neuronal.

La memantina es un antagonista no competitivo de NMDA, de afinidad moderada que puede proteger a las neuronas de la excitotoxicidad mediada por glutamato, sin impedir la actividad fisiológica de dichos receptores. Fue aprobada por la EMEA en febrero de 2002, para el tratamiento de la EA de intensidad moderada a severa, y por la FDA en el 2004.

---

<sup>99</sup> Scarpini, E.; Scheltens, P.; Feldman, H *Lancet Neurol.* **2003**, 2 (9), 539.

<sup>100</sup> Stuart, J. T.; Grossberg, G. T. *Clin. Interv. Aging* **2009**, 4, 367.



Al igual que los IACHEs, la memantina parece proporcionar a los pacientes moderados beneficios sintomáticos con los mínimos efectos adversos.<sup>101</sup> Recientemente, un nuevo estudio ha puesto de manifiesto que este fármaco no es eficaz para el tratamiento de EA de intensidad leve a moderada.<sup>102</sup>

#### 1.4.2. Hipótesis amiloide

La hipótesis amiloide mantiene que la acumulación de la proteína  $\beta$  amiloide es el evento patológico clave que conduce a la neurodegeneración en la EA.<sup>103</sup>

Una de las características que definen patológicamente la enfermedad de Alzheimer son las placas neuríticas o seniles y los ovillos neurofibrilares. Se demostró que el principal componente de las placas seniles era la sustancia amiloide. El análisis molecular precisó que se trataba de unos subproductos metabólicos anormales, del tipo péptido betaamiloide ( $A\beta$ ), derivados de la proteína precursora de  $A\beta$ , PPA, una proteína normal de la membrana sintetizada por la propias neuronas. El componente que predomina y se deposita primero es el péptido amiloide insoluble  $A\beta$  1-42 ( $A\beta$ 42). Según esta hipótesis, el depósito de  $A\beta$ 42 sería el principal factor patogénico de la EA.

Por otro lado, el proceso patológico que conduce a la formación de ovillos neurofibrilares, con elevado contenido en proteína *tau* hiperfosforilada, comenzaría supuestamente por un desequilibrio entre la producción y el aclaramiento de  $A\beta$ .

Sin embargo la idea de que la enfermedad de Alzheimer se produce por la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares ha sido criticada por falta de pruebas.<sup>104</sup>

Las terapias basadas en esta teoría se encuentran en fases avanzadas de desarrollo y tienen como objetivo la producción, agregación o acumulación del péptido  $A\beta$ . Los modelos sugieren que las terapias anti- $A\beta$  pueden ser eficaces si se analizan como agentes para prevenir o retrasar el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo los resultados obtenidos en pacientes están demostrando que son menos eficaces de lo que se pensaba.<sup>105</sup>

#### 1.4.3. Hipótesis metabólica

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la influencia de la hipercolesterolemia y la diabetes mellitus de tipo II con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

---

<sup>101</sup> Lleó, A.; Greenberg, S. M.; Growdon, J. H. *Annu. Rev. Med.* **2006**, 57, 513.

<sup>102</sup> Schneider, L. S.; Dagerman, K. S.; Higgins, J.; McShane, R. *Arch. Neurol.* **2011**, 68 (8), 991.

<sup>103</sup> Tanzi, R. E.; Moir, R. D.; Wagner, S. L. *Neuron* **2004**, 43, 605.

<sup>104</sup> Calleja-Puerta, S.; Hernández-Lahoz, C. *Alzheimer Real Invest. Demenc.* **2008**, 39, 4.

<sup>105</sup> Golde T. E.; Schneider, L. S.; Koo, E. H. *Neuron* **2011**, 69, 203.

La disminución en el metabolismo de glucosa se sabe que precede a la aparición de la patología cerebral y el deterioro cognitivo en la EA, pero su causa inicial no se conoce. En la periferia, el metabolismo de la glucosa es regulado por la señalización de la insulina. Antes se pensaba que la insulina no desempeñaba ningún papel significativo de regulación en el cerebro. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la insulina no sólo regula el metabolismo de la glucosa y de los lípidos en el cerebro, sino que también regula el desarrollo neuronal y las actividades de las neuronas y juega un papel importante en la memoria y el aprendizaje.

Por todo ello, el deterioro de la señalización de la insulina en el cerebro podría jugar un papel importante en el desarrollo de trastornos neurodegenerativos, ya que en estas circunstancias las neuronas están más expuestas a influencias tóxicas.

Además, esta teoría se ha visto apoyado por varios estudios recientes que muestran mejoras en los procesos de cognición y memoria mediante el tratamiento con insulina en pacientes con EA.<sup>106</sup> Sin embargo, el tratamiento de estos pacientes con insulina durante períodos largos de tiempo no es razonable, ya que esto puede agravar la desensibilización de los receptores de insulina.<sup>107</sup>

Podemos concluir que existen diversas hipótesis y eventos bioquímicos que tratan de explicar las causas de EA, como la degeneración de las neuronas colinérgicas, la formación de placas seniles y ovillo neurofibrilares, estrés oxidativo, deposición de hierro en sitios de lesión neuronal, procesos inflamatorios, excitotoxicidad, apoptosis, pérdida de factores neurotróficos, etc. Por lo tanto, el enfoque terapéutico actual, en el que los candidatos a fármacos están diseñados para poseer diversas propiedades farmacológicas y actuar sobre múltiples objetivos, ha estimulado el desarrollo de los fármacos de acción dual.<sup>237</sup>

Además, muchos estudios han sugerido que la inhibición de la MAO y de la AChE podría disminuir la deposición de  $\beta$ -amiloide, y por lo tanto inhibidores duales de estos dos enzimas podrían ser buenos candidatos a fármacos para el tratamiento de la EA. Como principal representante de este grupo de candidatos a fármacos tenemos el ladostigilo.<sup>238</sup>

## 1.5. LADOSTIGILO

El ladostigilo (TV3326, (*N*-propargil-3*R*-aminoindan-5-il)-etil metil carbamato), combina en una única molécula los grupos farmacóforos de la rasagilina (inhibidor selectivo de la MAO-B) y de la rivastigmina (inhibidor de la *acetil y butirilcolinesterasa*).<sup>108</sup>

---

<sup>106</sup> Liu, Y.; Liu, F.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Gong, C. *J. Pathol.* **2011**, 225, 54.

<sup>107</sup> Holscher, C. *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, 39, 891.

<sup>108</sup> Weinstock, M.; Goren, T.; Youdim, M. B. H. *Drug Dev. Res.* **2000**, 50, 216.

Así, el hecho de combinar estas dos acciones inhibitorias lo convierte en un potencial candidato para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y demencias con cuerpos de Lewy (**Figura 11**).<sup>109</sup>

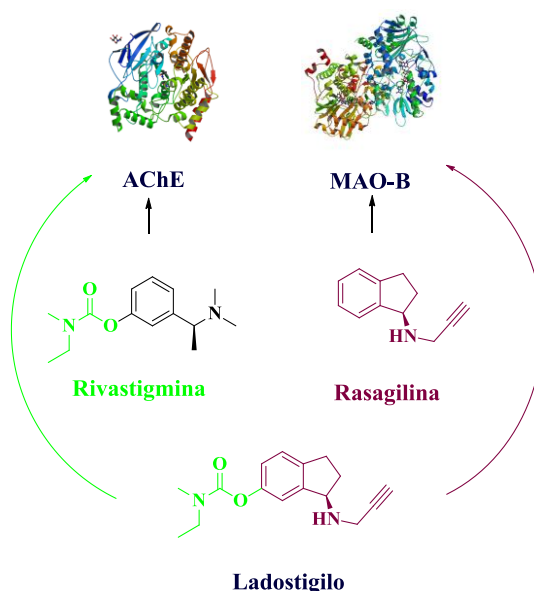


Figura 11

Tiene una actividad inhibitoria sobre la *acetil y butirilcolinesterasa* de mayor duración que la rivastigmina así como mantiene la actividad inhibitoria de la MAO-B y algunas de las acciones neuroprotectoras de la rasagilina.<sup>110</sup>

El ladostigilo fue diseñado con el objetivo de mantener la actividad neuroprotectora exhibida por la rasagilina y de presentar los requerimientos terapéuticos necesarios para retrasar la progresión de las enfermedades neurodegenerativas (EP con demencia, enfermedad de cuerpos de Lewy, demencias de cuerpos de Lewy con síntomas extrapiramidales) con demencia, anomalías en el comportamiento, depresión y síntomas extrapiramidales (**Figura 12**).<sup>111</sup>

El isómero S del ladostigilo, TV3279, es inhibidor de las *colinesterasas* pero no inhibe la MAO, y posee propiedades neuroprotectoras, poniendo nuevamente de manifiesto el hecho de que la actividad neuroprotectora/neurorestauradora es independiente de la inhibición de MAO.

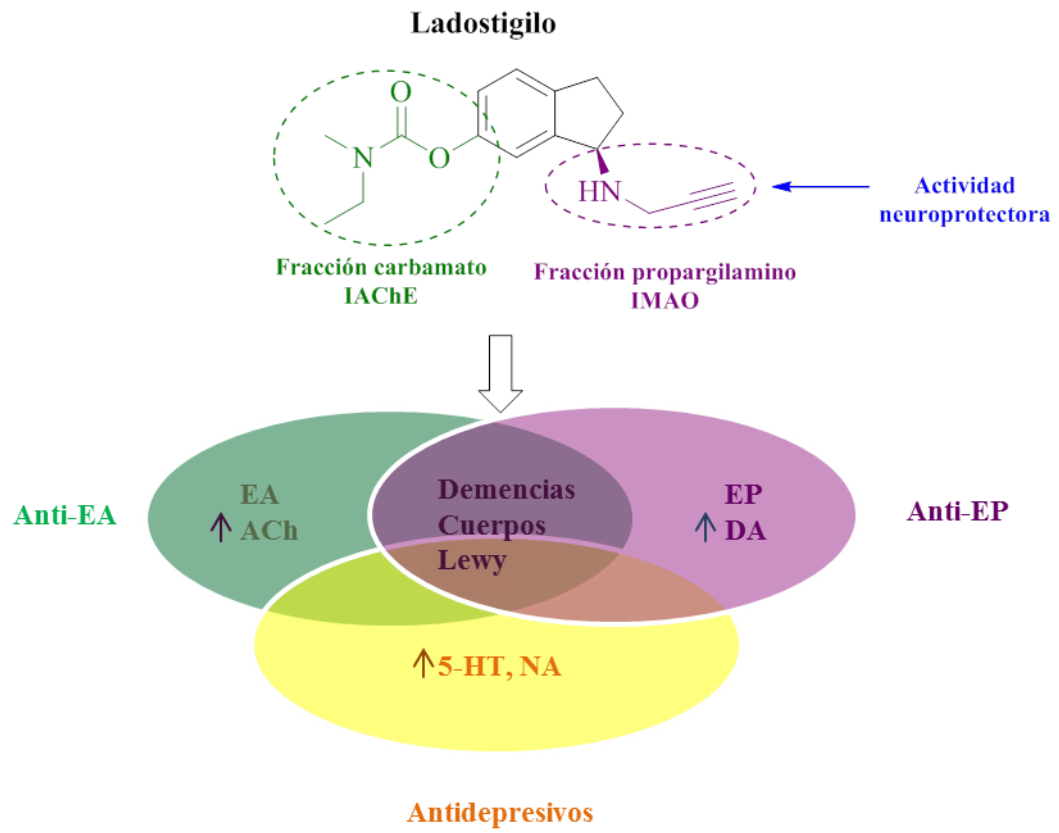
Al igual que ocurre con la rasagilina, el principal metabolito de este, el hidroxiaminoindano, posee actividad neuroprotectora per se, contribuyendo a las propiedades neuroprotectoras del ladostigilo.<sup>112</sup>

<sup>109</sup> Youdim, M. B. H.; Fridkin, M.; Zheng, H. *Mech. Aging Dev.* **2005**, 126, 317.

<sup>110</sup> Weinreb, O.; Bar-Am, O.; Amit, T.; Drigues, N.; Sagi, Y.; Youdim, M. B. H. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, 175, 318.

<sup>111</sup> Youdim, M. B. H.; Buccafusco, J. J. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, 26 (1), 27.

<sup>112</sup> Bar-Am, O.; Amit, T.; Youdim, M. B. H. *J. Neurochem.* **2007**, 103, 500.



**Figura 12**

## ***2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS***



## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Las isoformas de la *monoamino oxidasa* A y B modulan los niveles intracelulares de un gran número de aminas biógenas como la dopamina o la serotonina por catálisis de su desaminación oxidativa con la consecuente producción de peróxido de hidrógeno.<sup>113</sup>

El deterioro en el catabolismo de estos neurotransmisores y el daño oxidativo son importantes factores en la fisiología de las enfermedades neurodegenerativas, como la EA o la EP. Por esta razón la inhibición de la MAO-B representa una de las estrategias utilizadas para aliviar la sintomatología propia de este tipo de desórdenes.<sup>114,115</sup> Concretamente, los inhibidores selectivos de la MAO-B pertenecientes a la familia de las propargilaminas han sido ampliamente estudiados por sus potenciales propiedades neuroprotectoras.

El primer prototipo de esta clase de compuestos fue la selegilina (**VII**), un potente y selectivo inhibidor de la MAO-B empleado en el tratamiento de la EP.<sup>245</sup> El mecanismo de inhibición es de tipo “suicida”, ya que el enzima oxida el grupo propinilo presente en su estructura, dando lugar a un intermediario que a su vez inactiva el enzima.<sup>222</sup>

Una segunda generación de inhibidores tipo propargilamino surgió con el objetivo de sintetizar compuestos carentes de los efectos secundarios propios de la selegilina debido a los metabolitos anfetamínicos que genera.

El principal representante de esta segunda generación de inhibidores es la rasagilina (**VIII**), el cual es también un potente inhibidor selectivo de la MAO-B empleado en el tratamiento de la EP, que se metaboliza principalmente a aminoindano, el cual presenta una actividad antiparkinsoniana per se.<sup>116</sup>

Este nuevo inhibidor de MAO-B parece tener las características apropiadas para aliviar los síntomas de EP.<sup>206</sup> La rasagilina ha demostrado su capacidad para reducir las fluctuaciones motoras y exhibe una mayor eficacia que la terapia basada en agonistas dopaminérgicos.<sup>253</sup>

Además, la rasagilina, y otros derivados tipo propargilamino han demostrado poseer una actividad neuroprotectora adicional, debido a un efecto antiapoptótico, siendo este un tipo de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas, que es independiente de la inhibición de la MAO-B.

---

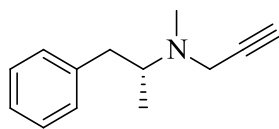
<sup>113</sup> Shih, J. C.; Chen, K.; Ridd, M. J. *Annu. Rev. Neurosci.* **1999**, 22, 197.

<sup>114</sup> Cesura, A. M.; Pletscher, A. *Prog. Drug Res.* **1992**, 38, 171.

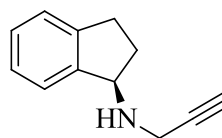
<sup>115</sup> Binda, C.; Hubálek, F.; Li, M.; Herzig, Y.; Sterling, J.; Edmondson, D. E.; Mattevi, A. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 8148.

<sup>116</sup> Chen, J. J.; Swope, D. M.; Dashtipour, K. *Clin. Ther.* **2007**, 29 (9), 1825.

Estos agentes actúan sobre diversas vías de señalización intracelular relacionadas con la cascada apoptótica, lo que puede ser la base de su potencial efecto neuroprotector sobre procesos patológicos con patogenia diferente.<sup>117</sup>



**VII**  
**selegilina**



**VIII**  
**rasagilina**

Por todo ello, en nuestro grupo de investigación y aprovechando la experiencia adquirida en los últimos años en la síntesis de derivados de indano con potencial actividad antiviral y/o antineoplásica, nos ha parecido interesante iniciar una línea de investigación destinada a la preparación de potenciales agentes neuroprotectores derivados del indano como una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

Como primer objetivo nos hemos propuesto la preparación de una serie de compuestos con potencial actividad neuroprotectora/neurorestauradora e inhibitoria de la MAO-B y de la *acetilcolinesterasa* derivados de la rasagilina.

Los estudios teóricos hechos hasta el momento (véase apartado 1.2.5.4.) demostraron que los puntos de anclaje de la rasagilina con el enzima se establecen, mayoritariamente, por la misma cara de la molécula y que el isómero R es aproximadamente 4 veces más potente que el isómero S.

Por esto, nos hemos planteado incorporar una función oxigenada en el anillo ciclopentánico del indano, en las posiciones 2 y 3, bien sea un grupo hidroxilo libre o esterificado, con el objetivo de formar una nuevo punto de anclaje con el receptor que incremente la afinidad con el mismo, y de este manera potencie la acción inhibitoria del enzima.

En la preparación de estos compuestos objetivo de estudio debemos tener en cuenta dos requisitos importantes a nuestro juicio en la unión del inhibidor con el receptor: en primer lugar la disposición *cis* de los potenciales grupos de unión y en segundo lugar la estereoquímica del carbono portador del grupo propargilamino, ya que es bien conocida la influencia de la estereoquímica de este carbono en la capacidad inhibitoria de la rasagilina.

---

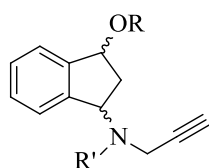
<sup>117</sup> Linazasoro, G. *Neurología* **2008**, 23 (4), 238.



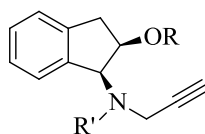
Por todo ello, nos pareció interesante cubrir todas las posibilidades antes descritas sintetizando y evaluando farmacológicamente una serie de derivados de rasagilina, en forma racémica, sustituidos en la posición 3 del anillo de indano, donde la relación entre los sustituyentes de las posiciones 1 y 3 fueron tanto de tipo *cis* como *trans* (**IX**), portadores de uno o dos grupos propargilo.<sup>118</sup>

Así mismo, decidimos llevar a cabo la preparación de los derivados tipo **X** y **XI**, sustituidos en la posición 2 del anillo de indano y portadores de uno o dos grupos propargilo, en forma enantioméricamente pura, fácilmente asequibles a partir de los respectivos aminoalcoholes comerciales, siguiendo los procedimientos sintéticos anteriormente puestos a punto por nosotros para la preparación de los compuestos tipo **IX**.

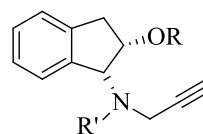
La posterior evaluación biológica de los diferentes compuestos preparados permitirá evaluar, o por lo menos aportar información, sobre la importancia de la disposición *cis* o *trans* y de la estereoquímica del enzima.



**IX** R = H, Ac, Bz  $\equiv$  CH  
R' = H, CH<sub>2</sub>-C



**X** R = H, Ac, Bz  $\equiv$  CH  
R' = H, CH<sub>2</sub>-C



**XI** R = H, Ac, Bz  $\equiv$  CH  
R' = H, CH<sub>2</sub>-C

Como segundo objetivo nos planteamos la introducción del agrupamiento carbamato, presente en el ladostigilo (**XII**) y en la rivastigmina (**XIII**), sobre el anillo de aminoindano de la rasagilina, con el fin de preparar potenciales candidatos a fármacos duales con actividad neuroprotectora.

De esta manera se busca preservar la actividad neuroprotectora de la rasagilina, y dotar a los compuestos de una actividad inhibitoria sobre AChE, incrementando así la transmisión colinérgica.<sup>119</sup>

Como ya hemos mencionado anteriormente, las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una naturaleza multifactorial, por lo que el empleo de fármacos que actúen sobre una única diana suelen ser insuficientes para el tratamiento de este tipo de desórdenes.

<sup>118</sup> González-Díaz, H.; Prado-Prado, F.; García-Mera, X.; Alonso, N.; Abeijón, P.; Caamaño, O.; Yáñez, M.; Munteanu, C. R.; Pazos, A.; Dea-Ayuela, M. A.; Gómez-Muñoz, M. T.; Garijo, M. M.; Sansano, J.; Ubeira, F. M. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 1698.

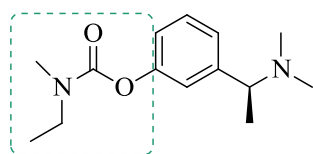
<sup>119</sup> Maruyama, W.; Weinstock, M.; Youdim, M. B. H.; Nagai, M.; Naoi, M. *Neurosci. Lett.* **2003**, *341*, 233.

Tampoco la combinación de varios fármacos es un tratamiento adecuado ya que presenta importantes limitaciones como el incumplimiento del mismo, interacciones fármaco-fármaco, reacciones adversas, etc.<sup>263</sup>

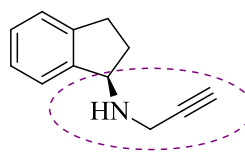
Por todo esto, el uso de fármacos de acción dual se ha convertido en una nueva y prometedora estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades multifactoriales, como EP, EA, Huntington o Esclerosis Lateral Amiotrófica.<sup>120</sup>

Como ya hemos comentado anteriormente, dentro de este campo, uno de los principales representantes de este tipo de fármacos es el ladostigilo, un inhibidor dual que se encuentra actualmente en fase III de desarrollo clínico.

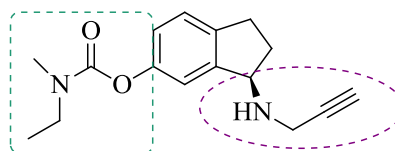
Contiene en su estructura el farmacóforo de la rasagilina (inhibidor selectivo e irreversible de la MAO-B) y el de la rivastigmina (inhibidor de la *acetil* y *butirilcolinesterasa*). Esto lo convierte en un potencial candidato para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.<sup>121</sup>



**XIII**  
**rivastigmina**



**VIII**  
**rasagilina**



**XII**  
**ladostigilo**

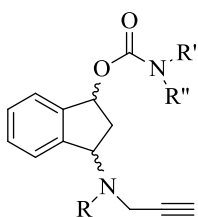
Por ello nos hemos propuesto la preparación de nuevos derivados del ladostigilo que incorporan las siguientes variaciones estructurales:

1. El agrupamiento carbamato, situado en el ladostigilo en la parte aromática del anillo de indano, se dispone aquí en el anillo de ciclopentano del indano.
2. Los nuevos derivados preparados pueden presentar uno o dos grupos propargilo sobre el átomo de nitrógeno.
3. La estructura etilmetilcarbamato presente en el ladostigilo ha sido reemplazada por las estructuras dimetil o dietilcarbamato.

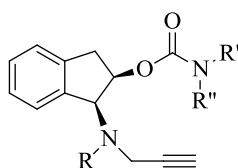
<sup>120</sup> Youdim, M. B. H.; Weinstock, M. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2001**, 6, 555.

<sup>121</sup> Weinreb, O.; Bar-Am, O.; Amit, T.; Drigues, N.; Sagi, Y.; Youdim, M. B. H. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, 175 (1-3), 318.

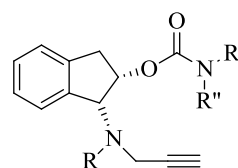
Así, hemos incorporado el agrupamiento carbamato, dietil- o dimetilcarbamato, en la posición 3 del anillo de indano, obteniendo derivados en su forma racémica, donde la relación entre los sustituyentes de las posiciones 1 y 3 fueron tanto de tipo *cis* como *trans* (**XIV**). Para finalizar este segundo objetivo solo restaba preparar los diferentes análogos de ladostigilo donde incorporamos el agrupamiento carbamato, dietil- o dimetilcarbamato, en la posición 2 del anillo de indano, al igual que antes, en forma enantioméricamente pura.



**XIV** R = H, CH<sub>2</sub>-C≡CH  
R' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
R'' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



**XV** R = H, CH<sub>2</sub>-C≡CH  
R' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
R'' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



**XVI** R = H, CH<sub>2</sub>-C≡CH  
R' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
R'' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

Todos los compuestos preparados, tipo **IX**, **X**, **XI**, **XIV**, **XV** y **XVI**, han sido sometidos a un proceso inicial de evaluación farmacológica de sus capacidades anti-Parkinson y anti-Alzheimer, mediante la realización de estudios *in vitro* para conocer la actividad inhibitoria que presentan frente a las dos isoformas de MAO, AChE y BChE.

Así mismo, también han sido sometidos a un proceso inicial de evaluación farmacológica para conocer su actividad neuroprotectora tanto en ausencia como en presencia de agentes neurotóxicos. En primer lugar se estudió la capacidad de nuestros compuestos de inducir un efecto neuroprotector en ausencia de cualquier estímulo neurotóxico. En segundo lugar se estudió el efecto neuroprotector de nuestros compuestos en presencia de glutamato, compuesto que provoca excitotoxicidad y muerte neuronal por una sobrecarga de calcio en la célula. Y en tercer lugar, se analizó la capacidad de nuestros compuestos de proteger a las neuronas del daño producido por el agua oxigenada la cual provoca la muerte neuronal por estrés oxidativo.

Por último cabe destacar que, a lo largo de este trabajo, también hemos abordado la realización de diferentes estudios teóricos. Así hemos realizado estudios QSAR de los principales inhibidores tanto de MAO-A como de MAO-B así como de los principales inhibidores de *acetil* y *butirilcolinesterasa*. Estos trabajos se encuentran publicados o en fase de publicación en diferentes revistas científicas:

- González-Díaz, H.; Prado-Prado, F.; García-Mera, X.; Alonso, N.; Abeijón, P.; Caamaño, O.; Yáñez, M.; Munteanu, C. R.; Pazos, A.; Dea-Ayuela, M. A.; Gómez-Muñoz, M. T.; Garijo, M. M.; Sansano, J.; Ubeira, F. M. "MIND-BEST: Web Server for Drugs and Target Discovery;

Design, Synthesis, and Assay of MAO-B inhibitors and Theoretical-Experimental Study of G3PDH Protein from *Trichomonas gallinae*” *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 1698.

- Francisco Prado-Prado, Xerardo García-Mera, Manuel Escobar, Nerea Alonso, Olga Caamaño, Matilde Yáñez, Humberto González-Díaz. “3D MI-DRAGON: new model for reconstruction of US FDA drug-target network and theoretic-experimental studies of rasagiline derivatives inhibitors for AChE” *European Journal of Medicinal Chemistry*, sometido.

Además, y en colaboración con el grupo del profesor Stefano Moro, hemos realizado un estudio de la interacción de los diferentes compuestos preparados con el enzima MAO-B. Utilizando las estructuras del sitio activo de la proteína, de acuerdo con los datos descritos para algunos homólogos de la rasagilina (registrados en el Protein Data Bank ID: 2c64, 2c65, 2c66 y 2c67) analizaremos la interacción de los diferentes tipos de compuestos previstas en esta cavidad.

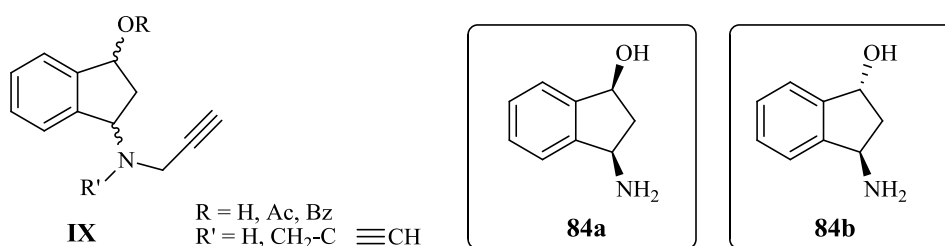
### ***3. QUÍMICA: PARTE TEÓRICA Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS***



### 3. QUÍMICA: PARTE TEÓRICA Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

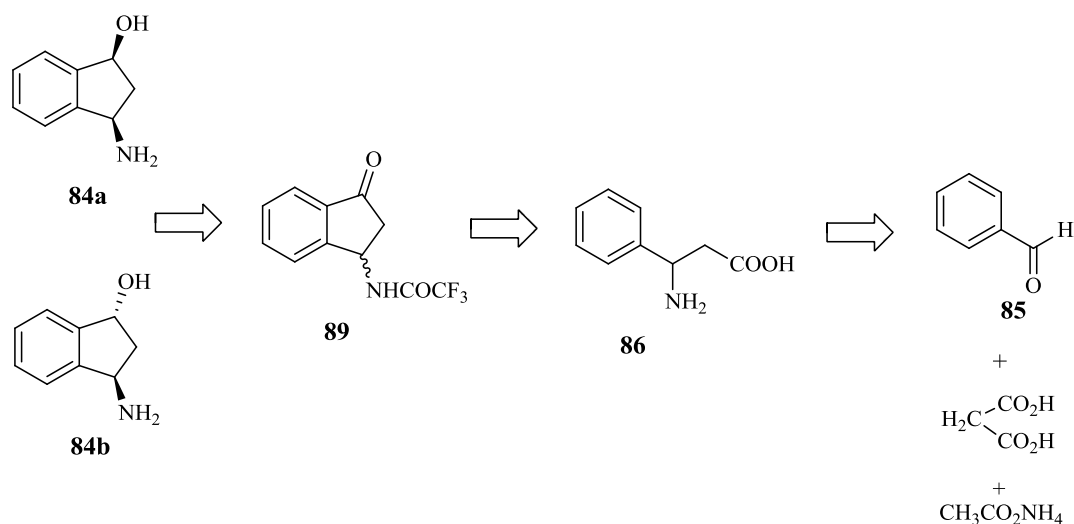
#### 3.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE RASAGILINA SUSTITUIDOS EN LA POSICIÓN 3 (IX)

Para la síntesis de los análogos **IX** se utilizaron los aminoalcoholes **84a** y **84b** como precursores, ya que una vez realizada la propargilación de los mismos, los compuestos obtenidos nos servirán para preparar el resto de los análogos deseados.



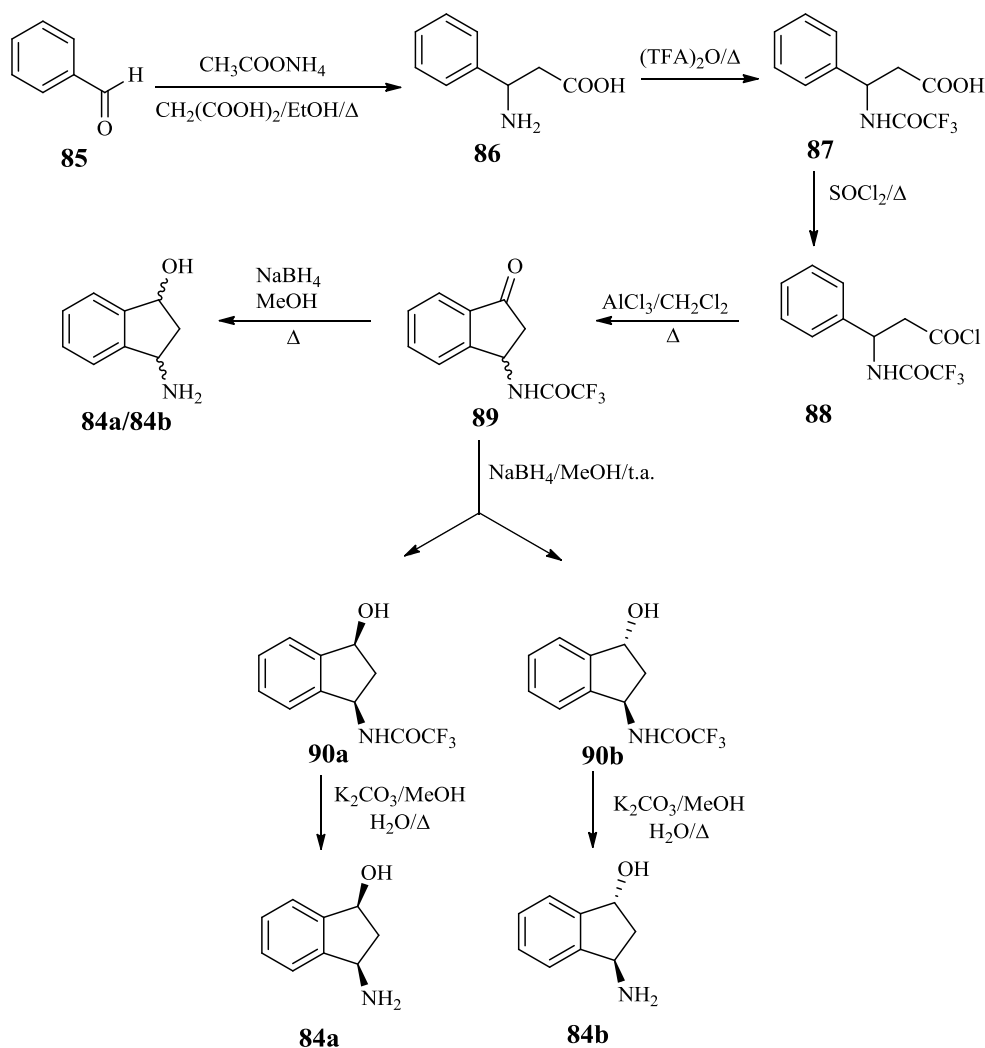
##### 3.1.1. Síntesis de los aminoalcoholes precursores **84a** y **84b**

En el análisis retrosintético que se presenta en el **esquema 30** se puede apreciar como los aminoalcoholes **84a** y **84b** podrán obtenerse sin dificultad por la hidrólisis y reducción del precursor **89**. A este precursor se accederá por ciclación intramolecular de Friedel-Crafts del  $\beta$ -aminoácido **86**, el cual a su vez se obtendrá por reacción entre el benzaldehído (**85**), ácido malónico y acetato amónico.<sup>122</sup>



En concreto, el procedimiento sintético planteado para la obtención de los aminoalcoholes **84a** y **84b** es el que se refleja en el **esquema 31**:

<sup>122</sup> Quermone, M. A.; Dallemagne, P.; Louchahi-Raoul, J.; Pilo, J. C.; Rault, S.; Robba, M. *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, 27, 961.



Esquema 31

### 3.1.1.1. Acilación de Friedel-Crafts

En las reacciones de Friedel-Crafts se forman enlaces C-C por Sustitución Aromática Electrónica ( $\text{S}_{\text{AE}}$ ), en presencia de ácidos de Lewis o derivados de ácidos carboxílicos con sustratos aromáticos para dar alquil o alcanoil derivados de éstos. La acilación de Friedel-Crafts<sup>123,124,125</sup> es el método más importante de preparación de cetonas arílicas.

En esta reacción un compuesto aromático reacciona con un halogenuro de acilo, en presencia de un ácido de Lewis, normalmente tricloruro de aluminio, o incluso de medios fuertemente próticos como  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , o ácido polifosfórico, para dar lugar a una cetona arílica.

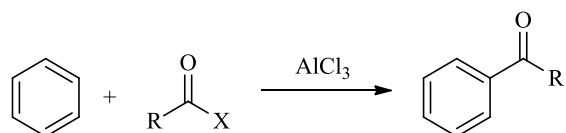
<sup>123</sup> Olah, G. A. *Friedel-Crafts and Related Reactions*, Wiley, New York, 1964.

<sup>124</sup> Gjos, N.; Gronowitz, S. *Acta Chem. Scand.* **1970**, 24, 99.

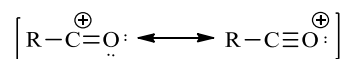
<sup>125</sup> Zhao, Y-F.; Xi, S-K.; Tian, Y-F.; Song, A-T. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 1617.



Además del halogenuro de acilo como agente acilante se pueden emplear también ácidos carboxílicos, anhídridos o cetenas. La utilización de carboxilatos de alquilo puede originar principalmente productos de alquilación.<sup>126</sup>



El agente acilante puede corresponder a un derivado de un ácido alifático o aromático y, a diferencia de la alquilación de Friedel-Crafts, no suelen ocurrir procesos de reordenamiento debido a la mayor estabilidad relativa de los cationes arilio, por su estructura resonante (**Esquema 32**)  $\text{RCO}^+$ , por lo que la reacción transcurre de forma limpia.



**Esquema 32**

Se pueden emplear los cuatro tipos de haluros de acilo, siendo el orden de actividad, generalmente, el siguiente:  $\text{I} > \text{Br} > \text{Cl} > \text{F}$ .<sup>127</sup> Los cloruros son los que más se emplean por su bajo coste, fácil asequibilidad y por ser lo suficientemente reactivos. Como catalizador se emplean los ácidos de Lewis y su orden de reactividad es:  $\text{AlBr}_3 > \text{AlCl}_3 > \text{GaCl}_3 > \text{FeCl}_3 > \text{SbCl}_5 > \text{ZrCl}_4 > \text{BCl}_3 > \text{BF}_3 > \text{SbCl}_3$ .<sup>128</sup> Sin embargo este orden se puede alterar dependiendo de las condiciones de reacción en cuanto a tipo de sustrato, reactivo, etc.

A diferencia de la alquilación de Friedel-Crafts es necesario de un exceso de más de un mol de catalizador por mol de reactivo, pues el primer mol se coordina con el oxígeno carbonílico del grupo acilante<sup>129</sup> y permanece así en el producto cetónico final. En estas reacciones el tratamiento acuoso final es necesario para liberar la cetona formada de su complejo con el cloruro de aluminio.

Una aplicación importante de esta reacción es la variante intramolecular, que permite realizar el cierre de anillos.<sup>130</sup> Éste puede llevarse a cabo cuando el grupo acilante (haluro de acilo, ácido carboxílico o anhídrido de ácido) está en la posición adecuada.

<sup>126</sup> Roberts, R. M.; Khalaf A. A. *Friedel-Crafts Alkylation Chemistry. A Century of Discovery* Marcel Dekker, New York, 1984.

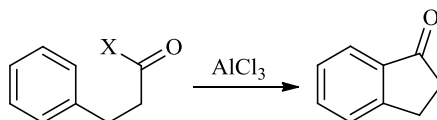
<sup>127</sup> a) Yamase, Y. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1961**, 34, 480. b) Corriu, L. *Bull. Soc. Chim. Fra.* **1965**, 3, 821.

<sup>128</sup> Rusell, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 4834.

<sup>129</sup> Chevrier, B.; Le Carpentier, J. M.; Weiss, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94 (16), 5718.

<sup>130</sup> Hashimoto, I.; Takatsuka, R. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1977**, 50, 2495.

La acilación intramolecular se aplica fundamentalmente para la obtención de anillos de 5, 6 o 7 miembros y es una de las metodologías más simples y eficientes en el cierre de anillos benzocondensados de tipo 1-indanonas y 1-tetralonas (**Esquema 33**).<sup>131</sup>



**Esquema 33**

En el caso de la ciclación intramolecular de  $\beta$ -aminoácidos, esta reacción se puede llevar a cabo por dos métodos distintos. El primero de ellos consiste en proteger inicialmente con anhídrido trifluoroacético [(TFA)<sub>2</sub>O] la función amina del aminoácido. A continuación, el ácido *N*-protegido reacciona con un exceso de cloruro de tionilo en benceno obteniéndose el cloruro de ácido que después de lavarlo con éter, sin otra purificación, se utiliza en una reacción de Friedel-Crafts en sulfuro de carbono como disolvente y en presencia de tricloruro de aluminio.<sup>132</sup>

El segundo de los métodos consiste en la ciclación en una sola etapa del aminoácido adecuado, tratándolo en un primer lugar con ácido trifluoroacético (TFA) para obtener así el correspondiente trifluoroacetato de amonio, el cual se somete a reflujo en anhídrido trifluoroacético obteniendo la oxoamida cíclica deseada.<sup>133,134</sup>

El segundo de los métodos consiste en la ciclación en una sola etapa del aminoácido adecuado, tratándolo en un primer lugar con ácido trifluoroacético (TFA) para obtener así el correspondiente trifluoroacetato de amonio, el cual se somete a reflujo en anhídrido trifluoroacético obteniendo la oxoamida cíclica deseada.

En el caso de  $\beta$ -aminoácidos derivados del benceno, la ciclación llevada a cabo por el segundo método no tiene lugar, recuperándose el producto de partida trifluoroacetilado. Por este motivo para la preparación de derivados del anillo de indano hemos decidido seguir la primera de las metodologías.<sup>306</sup>

<sup>131</sup> Nguyen, P.; Corpuz, E.; Heidelbaugh, T. M.; Chow, K.; Garst, M. E. *J. Org. Chem.* **2003**, 68(26), 10195.

<sup>132</sup> Rault, S.; Dallemagne, P.; Robba, M. *Bull. Soc. Chim. Fra.* **1987**, 6, 1079.

<sup>133</sup> Dallemagne, P.; Rault, S.; Cugnon de Sevicourt, M.; Hassan, M.; Robba, M. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2607.

<sup>134</sup> Dallemagne, P.; Rault, S.; Gordazila, M.; Robba, M. *Heterocycles* **1987**, 26, 3233.

Una forma de obtener el  $\beta$ -aminoácido de partida es siguiendo la metodología descrita por Rodionov,<sup>135</sup> modificada posteriormente por Johnson,<sup>136</sup> que consiste en hacer reaccionar el aldehído adecuado con ácido malónico y acetato amónico.

En nuestro caso concreto, el  $\beta$ -aminoácido **86** se obtuvo por reacción del benzaldehído con acetato amónico y ácido malónico en etanol a reflujo durante 15 horas, con un rendimiento del 61%.

La ciclación intramolecular de Friedel-Crafts de ácidos arilpropiónicos, en presencia de ácidos de Lewis, es, como ya hemos mencionado, el método indicado para la preparación de derivados de indano. Para poder llevar a cabo este planteamiento, la protección previa del grupo amino del compuesto **86** es imprescindible, debido a su facilidad para interferir con ácidos de Lewis.

Esta protección se llevará a cabo mediante la conversión de dicho grupo amino en un grupo amida, siendo esta conversión el método más conveniente y utilizado en la protección de estos grupos.

El trifluoroacético es ampliamente utilizado en síntesis orgánica como grupo protector, debido a su fácil desprotección. Hay una serie de mecanismos y métodos para la trifluoroacetilación de aminas, que incluyen el uso de anhídrido trifluoroacético o el etiltrifluoroacético entre otros.

En nuestro caso concreto hemos empleado el anhídrido trifluoroacético a pesar de las desventajas que presenta como su bajo punto de ebullición, su volatilidad o su naturaleza higroscópica y corrosiva, además de que se forma ácido trifluoroacético en el medio de reacción.

La protección se ha llevado a cabo disolviendo el  $\beta$ -aminoácido **86** en un exceso de anhídrido trifluoroacético a temperatura ambiente durante 24 horas, obteniendo la amida **87** con un rendimiento del 85%.

Una vez realizada la protección del grupo amino del compuesto **86**, llevamos a cabo la conversión del aminoácido en un cloruro de ácido, ya que los derivados halogenados de ácidos carboxílicos en presencia de ácidos de Lewis dan reacciones de Friedel-Crafts con mucha facilidad.

---

<sup>135</sup> Rodionov, W. M.; Malewinskaya, E. *Th. Ber.* **1926**, 59, 2952.

<sup>136</sup> Johnson, T. B.; Livar, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, 58, 299.

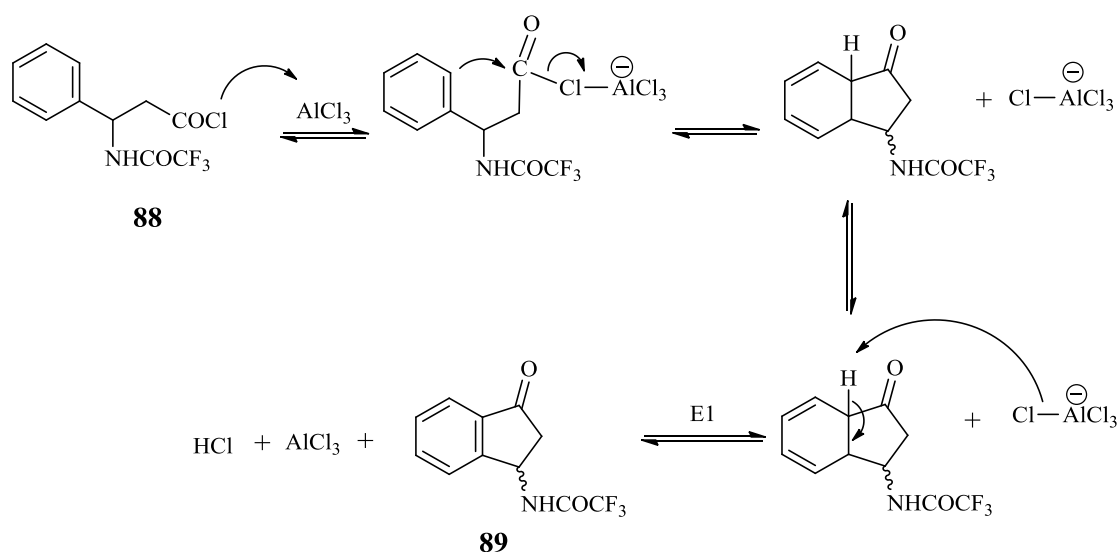
Concretamente, los cloruros de ácidos se pueden preparar fácilmente por reacción con cloruro de tionilo o con haluros de fósforo ( $\text{PCl}_5$ ,  $\text{PCl}_3$  o  $\text{POCl}_3$ ).

En nuestro caso, hemos empleado el cloruro de tionilo, cuyas principales ventajas son que los demás productos de reacción son gaseosos ( $\text{HCl}$ ,  $\text{SO}_2$ ) y el exceso de cloruro de tionilo se elimina fácilmente por destilación.<sup>137</sup> Por lo tanto, hemos hecho reaccionar el compuesto **87** con un exceso de cloruro de tionilo durante 24 horas y a  $82^\circ\text{C}$ , aislándose un sólido amarillo que fue identificado como el cloruro de ácido **5** con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

Una vez preparado el compuesto **88** correspondiente, hemos realizado el proceso de ciclación mediante la adición, gota a gota, de una disolución del cloruro de ácido **88** en diclorometano anhidro, sobre una suspensión de  $\text{AlCl}_3$ , también en diclorometano anhidro, en atmósfera de argón y a  $0^\circ\text{C}$ . Finalizada la adición, la reacción se puso a reflujo durante 24 horas y tras la correspondiente elaboración hemos obtenido la cetoamida **89** con un rendimiento del 62%.

Cuando la misma reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente, se produce la formación de un producto secundario de forma mayoritaria todavía sin identificar. Tras la realización de varios ensayos, verificamos que la disminución de la temperatura favorece la formación mayoritaria del compuesto **89**, disminuyéndose la formación del compuesto secundario

El mecanismo de ciclación intramolecular de Friedel-Crafts, a partir del cloruro de ácido **88**, se muestra en el **esquema 34**:



<sup>137</sup> Smith, M. *Organic Chemistry: An Acid-Base Approach* (953-954). CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, 2011.

### 3.1.1.2. Reducción directa de oxoamidas

La reducción de compuestos bifuncionales con grupos amida y éster, o con grupos oxima y éster, mediante hidruros metálicos complejos, constituye uno de los métodos preparativos más adecuados para la obtención de aminoalcoholes.

Las aldoximas y las cetoximas pueden ser reducidas a aminas primarias mediante el empleo de diferentes reductores, siendo el  $\text{LiAlH}_4$ <sup>138,139,140</sup> el agente reductor por excelencia.

A pesar de esto, Rerick y cols.<sup>141</sup> afirman que la reducción de la oxima de la ciclododecanona y de diversas arilcetoximas con  $\text{LiAlH}_4$ , además de obtener la correspondiente amina primaria, se obtiene también una amina secundaria isómera, siendo en la mayoría de los casos estudiados un producto minoritario de la reacción. Los autores aseguran que el  $\text{LiAlH}_4$  cataliza la transposición de Beckmann de la oxima, seguida de la reducción.

En este sentido, Sasatami y cols.<sup>142</sup> realizan un aprovechamiento sintético importante al transformar, de un modo sencillo, oximas en las correspondientes aminas secundarias transpuestas, utilizando hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco a 0°C.

Yoon y cols.<sup>143</sup> realizaron un estudio exhaustivo con hidruro de aluminio ( $\text{AlH}_3$ ) como agente reductor selectivo de compuestos orgánicos conteniendo diversos grupos funcionales. El  $\text{AlH}_3$  es preparado a partir de  $\text{LiAlH}_4$  en THF con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 100%, precipitando sulfato de litio y obteniéndose una disolución relativamente estable con hidruro de aluminio.<sup>144</sup>

Concluyen que el  $\text{AlH}_3$  es un reactivo excelente para reducir cetoximas y amidas a aminas, obteniéndose buenos rendimientos en tiempo de reacción cortos, aislándose las aminas secundarias transpuestas en menor proporción que con  $\text{LiAlH}_4$  (5% frente a 9-98%, según condiciones de reacción, para la reducción de la oxima de la acetofenona).

Este reactivo también es útil para reducir cetoésteres enolizables a dioles con rendimientos de moderados a buenos

Podemos utilizar también para la reducción de este tipo de compuestos, zinc y ácido acético, etóxido sódico,  $\text{BH}_3$ <sup>145</sup> y sodio y alcohol.<sup>146</sup>

---

<sup>138</sup> Lee-Ruff, E.; Wan, W.-Q.; Jiang, J.-L. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2114.

<sup>139</sup> Boumchita, H.; Legraverend, M.; Bisagni, E. *Heterocycles* **1991**, 32, 1785

<sup>140</sup> Brown, H. C.; Weissman, P. M.; Yoon, N. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1458.

<sup>141</sup> Rerick, M. N.; Trottier, C. H.; Daignault, R. A.; De Foe, J. D. *Tetrahedron Lett.* **1963**, 10, 629.

<sup>142</sup> Sasatami, S.; Miyazaki, T.; Maruoka, K.; Yamamoto, H. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 4711.

<sup>143</sup> Yoon, N. M.; Brown, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 2927.

<sup>144</sup> Brown, H. C.; Yoon, N. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1464.

<sup>145</sup> Lane, C. F. *Chem. Rev.* **1976**, 76, 773.

<sup>146</sup> Larock, R. C. *Comprehensive Organic Transformations*. V. C. H., New York, 1989, pag. 424.

La hidrogenación catalítica también es efectiva.<sup>147,148,149</sup>

Así mismo, la vía más directa de obtención de aminoalcoholes a partir de aminoésteres es la reducción utilizando hidruros metálicos.

El  $\text{LiAlH}_4$ , puede reducir cuantitativamente ésteres a alcoholes y opera con buenos rendimientos en la reducción de aminas, especialmente cuando éstas son secundarias o terciarias, pues con amidas primarias la reducción suele ser más lenta e incompleta.<sup>322</sup>

Además del  $\text{LiAlH}_4$ , el  $\text{LiEt}_3\text{BH}$  y el  $\text{LiBH}_4$ <sup>150</sup> reducen con gran facilidad los ésteres a alcoholes en el seno de  $\text{Et}_2\text{O}$  o THF, siendo estos últimos reductores más selectivos<sup>151,152</sup> cuando están presentes otros grupos funcionales fácilmente reducibles con el  $\text{LiAlH}_4$ .

El diborano es un agente reductor suave, de características diferentes al  $\text{LiAlH}_4$ . Así, Brown y cols.<sup>153</sup> han comprobado que la disolución de diborano en THF reduce rápidamente las amidas, tanto primarias como secundarias o terciarias, a las correspondientes aminas con rendimientos cercanos al 100%. Aunque el diborano reduce también los ésteres a alcoholes, lo hace con mayor lentitud.

Kornet y cols.<sup>154</sup> describen ejemplos en los que se logra la reducción selectiva de un grupo funcional amida en presencia de un grupo éster, mediante el empleo de diborano, obteniéndose el aminoéster con rendimientos de razonables a buenos.

Feuer y cols.<sup>155</sup> reducen también con diborano oximas, oximas-éteres y oximas-ésteres a las correspondientes aminas con buenos rendimientos.

Sin embargo, Brown y cols.<sup>156,157</sup> describen la reducción efectiva de ésteres y amidas, incluso primarias, mediante el complejo  $\text{BH}_3 \cdot \text{S}(\text{CH}_3)_2$  a los correspondientes alcoholes primarios y aminas, con rendimientos altos o muy altos, siempre y cuando el  $\text{S}(\text{CH}_3)_2$  se vaya destilando de la mezcla de reacción según ésta transcurre.

---

<sup>147</sup> Grunewald, G. L.; Sall, D. J.; Moon, J. A. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 433.

<sup>148</sup> Rylander, P. N. *Hydrogenation Methods*. Academic Press, London, 1985.

<sup>149</sup> Murakami, M.; Kang, J-W. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1963**, 36, 763.

<sup>150</sup> Brown, H. C.; Krishnamurthy, S. *Tetrahedron* **1979**, 35, 567.

<sup>151</sup> Soai, K.; Ookawa, A. J. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 4000.

<sup>152</sup> Brown, H. C.; Kim, S. C.; Krishnamurthy, S. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1.

<sup>153</sup> Brown, H. C. Heim, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 3566.

<sup>154</sup> Kornet, M. J.; Thio, P. A.; Tan, S. I. *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 3637.

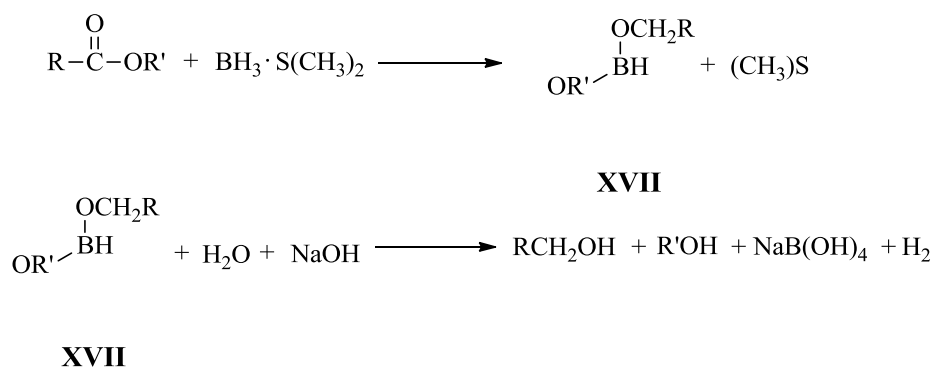
<sup>155</sup> Feuer, H.; Braunstein, D. M. *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 1817.

<sup>156</sup> Brown, H. C.; Choi, Y. M. *Synthesis* **1981**, 439.

<sup>157</sup> Brown, H. C.; Narasimhan, S.; Choi, Y. M. *Synthesis* **1981**, 441.

Caamaño y cols.<sup>158</sup> describen la reducción con este reactivo de cianoésteres a los correspondientes aminoalcoholes en THF a reflujo con rendimientos aceptables.

Los ésteres de ácidos carboxílicos en estas condiciones se reducen inicialmente a un intermediario de tipo dialcoxiborano **XVII**, que por una posterior hidrólisis, preferentemente en medio alcalino, conduce a los correspondientes alcoholes (**Esquema 35**).



**Esquema 35**

El NaBH<sub>4</sub> es un agente reductor mucho menos enérgico que los anteriores. Sin embargo, los agentes formados por combinación del mismo con metales de transición han sido aplicados a la reducción de diversos grupos funcionales.

La combinación de TiCl<sub>4</sub>/NaBH<sub>4</sub> ha sido empleado con buenos rendimientos para la reducción de ésteres a alcoholes y de nitrilos a aminas, aunque en la reducción de derivados nitrados y carboxamidas los resultados inicialmente comunicados resultaron ser poco satisfactorios.<sup>159</sup>

Posteriormente, Kano y cols.<sup>160</sup> realizaron un estudio más completo de las propiedades reductoras de este reactivo, encontrando que es un buen sistema reductor de ácidos carboxílicos, cloruros de ácido, carboxamidas, oximas, nitroderivados y sulfóxidos.

El L-Selectride (triseccbutil borohidruro de litio) reduce eficazmente cetonas a alcoholes de una forma estereoselectiva.<sup>161,162</sup>

<sup>158</sup> Figueira, M. J.; Blanco, M. J.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; López, C. *Synthesis* **2000**, 1459.

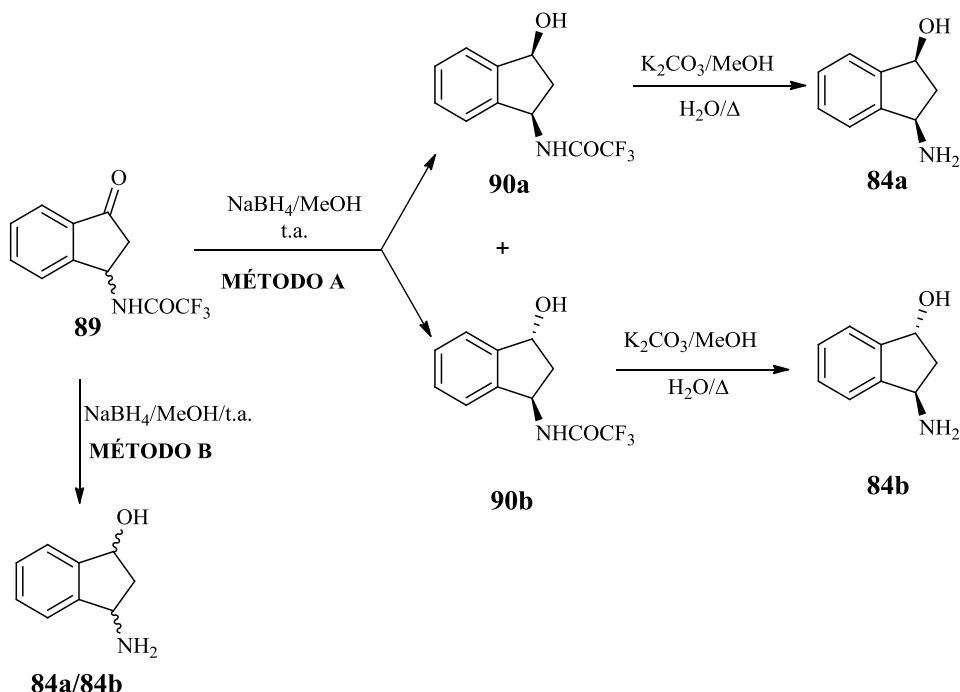
<sup>159</sup> Brown, H. C.; Subba, B. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 3164.

<sup>160</sup> Kano, S.; Tanaka, Y.; Sugino, E.; Hibino, S. *Synthesis*, **1980**, 695.

<sup>161</sup> Brown, H. C.; Krishnamurthy, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 7159.

<sup>162</sup> Fernández, F.; García-Mera, X.; López, C.; Rodríguez, G.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 4805.

Concretamente y para la síntesis de nuestros aminoalcoholes **84a** y **84b** optamos por utilizar como agente reductor  $\text{NaBH}_4$  (**Esquema 36**):



**Esquema 36**

Como podemos observar se nos plantean dos posibles métodos. El primero de los métodos (**MÉTODO A**) consiste en una reducción selectiva del grupo cetona, obteniéndose un hidroxiderivado, pudiendo abordar la separación de los isómeros *cis/trans* en este punto.<sup>163</sup> En los distintos ensayos efectuados se varió tanto la proporción de reactivo como el tiempo de reacción.

Así, se utilizó una proporción de **89**/ $\text{NaBH}_4$  de 1/2 y se observó que, aproximadamente, a los 15 minutos de reacción se completaba la misma, procediendo a su elaboración. En este punto, podemos realizar una separación de isómeros sometiendo el bruto de reacción a una cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando como eluyente Hex/Acetona 8:1.

A continuación se procedió a la escisión del grupo trifluoroacetamido de los dos isómeros para la obtención de los aminoalcoholes buscados. Para ello sobre una disolución del hidroxiderivado correspondiente en MeOH adicionamos una disolución de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en agua. Calentamos la mezcla a reflujo durante 2 horas hasta que la reacción se completa.<sup>164</sup>

<sup>163</sup> Gordaliza, M.; Dallemagne, P.; Rault, S.; Robba, M. *Anales de Química* **1989**, 85, 66.

<sup>164</sup> a) Martins, J. E. D.; Mehlecke, C. M.; Gamba, M.; Costa, V. E. U. *Tetrahedron Asymmetry* **2006**, 17, 1817. b) Kudzin, Z.; Lyzwa, P.; Luczak, J.; Andrijewski, G. *Synthesis* **1997**, 44. c) Bergeron, R. J.; McManis, J. S. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 3108.



Este método nos permite obtener los aminoalcoholes por separado, preparándolos directamente a partir de los hidroxiderivados obtenidos, ya que su purificación por columna cromatográfica resulta prácticamente imposible.

En el segundo de los métodos (**MÉTODO B**), siguiendo el procedimiento descrito por Kano y cols.<sup>342</sup>, se hace reaccionar la oxoamida correspondiente con NaBH<sub>4</sub> en MeOH a temperatura ambiente con el fin de obtener la mezcla de aminoalcoholes **84a/84b**, reduciendo el grupo cetona y provocando la escisión del grupo trifluoroacetamido en un solo paso.

Se hicieron distintos ensayos variando la proporción de reactivo y el tiempo de reacción. Se observó que en el caso de usar una proporción de oxoamida/NaBH<sub>4</sub> de 1/5 y dejando la reacción aproximadamente cinco días se obtenía la mezcla de aminoalcoholes **84a/84b** con un rendimiento del 56%. En este caso, se hace necesario el calentamiento de la reacción a 60°C y se hace imposible la separación de los isómeros por columna cromatográfica.

Nosotros nos hemos decidido, después de todos los ensayos previos realizados, por utilizar el primero de los métodos debido a que el tiempo de reacción y la cantidad de reactivo se ven considerablemente reducidos.

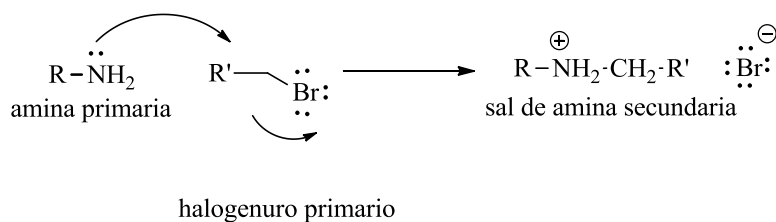
Para ello hemos hecho reaccionar la cetoamida **6** con NaBH<sub>4</sub> en MeOH agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min hasta que la reacción se completa. Así obtenemos la mezcla de hidroxiamidas **90a/90b** con un rendimiento del 77%, en una proporción **90a:90b/60:40**.

A continuación, hemos sometido la mezcla de hidroxiamidas **90a/90b** a tratamiento con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> obteniendo la mezcla de aminoalcoholes **84a/84b** con un rendimiento del 93% y en idéntica proporción que la mezcla de hidroxiamidas isómeras de partida.

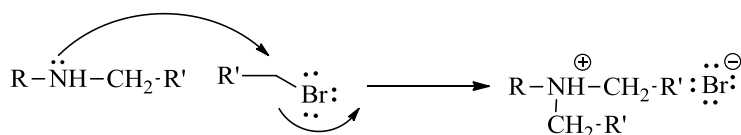
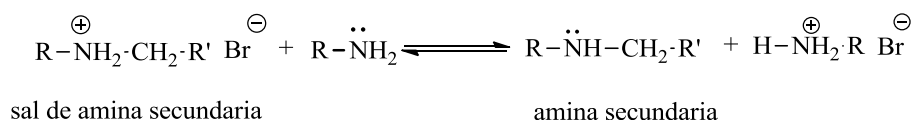
Ha sido, precisamente, sobre esta mezcla sobre la que hemos llevado a cabo el proceso de propargilación del grupo amino y será tras este proceso cuando realizaremos la separación de los isómeros.

### **3.1.2. Alquilación de aminas. Propargilación de los aminoalcoholes 84a/84b**

Las aminas reaccionan con los halogenuros de alquilo primarios para formar halogenuros de amonio alquilados. La reacción transcurre mediante el mecanismo S<sub>N</sub>2, y por lo tanto los halogenuros terciarios, estéricamente impedidos, no reaccionan y los secundarios pueden dar lugar a reacciones de eliminación.



El problema con estas reacciones de *N*-alquilación es que la sal de la amina se desprotona y la amina secundaria resultante es nucleófila y puede reaccionar con otra molécula de halogenuro de alquilo.



La aplicación de la reacción de alquilación se ve seriamente limitada ante la dificultad que entraña detener la reacción en la etapa de monoalquilación. Incluso agregando un solo equivalente de halogenuro, algunas moléculas de amina reaccionan una, dos y hasta tres veces, produciendo la sal de tetralquilamonio. El resultado de la reacción es la formación de una mezcla compleja de aminas.

Se agrega una base débil (con frecuencia  $\text{NaHCO}_3$  o  $\text{NaOH}$  diluido) para desprotonar las aminas alquiladas intermedias y para neutralizar las grandes cantidades de  $\text{HX}$  que se generan en la reacción.

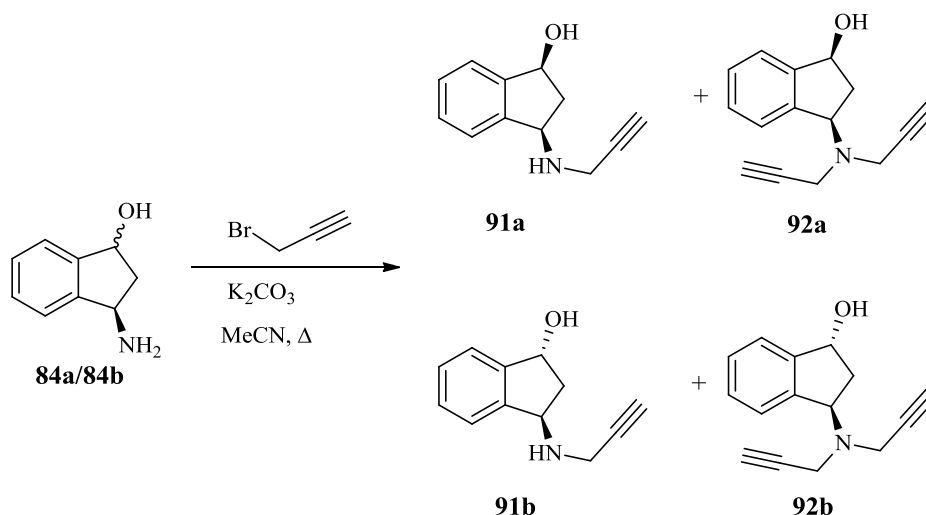
Nosotros, para introducir el grupo propargilo hemos utilizado el bromuro de propargilo en presencia de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  como base.<sup>165</sup> Se realizaron diversos ensayos modificando la temperatura de adición y los equivalentes de reactivo y se observó que en todos los casos se produce la dialquilación del grupo amino. Además, se verificó que el grupo hidroxilo en ningún caso sufre la alquilación. Cuando el número de equivalentes de bromuro de propargilo es de 0.8 se favorece la formación del compuesto monopropargilado.

<sup>165</sup> Graul, A.; Castañer, J. *Drugs of the Future* **1996**, 21 (9), 903.

Como en nuestro caso, resultaba interesante obtener tanto el compuesto monoalquilado como el dialquilado, utilizamos 2 equivalentes de bromuro de propargilo.

Por lo tanto, sobre una disolución de la mezcla de aminoalcoholes **84a/84b** disueltos en MeCN, se adicionó el bromuro de propargilo, bajo atmósfera de argón, gota a gota y a 0°C, y a continuación se reflujo durante 24 horas. Tras la correspondiente elaboración se obtuvo una mezcla de 4 compuestos integrada por los isómeros *cis* y *trans* de los derivados mono- y dipropargilados en la siguiente proporción: **91a/91b/92a/92b**- 9/6.6/48.2/36.2.

Como se puede observar se obtienen preferentemente los dos isómeros dipropargilados **92/91**- 84.5/15.5, mientras que si analizamos en cada par de derivados (mono- y dipropargilado) el porcentaje de formación de isómeros *cis* y *trans* podemos observar una ratio idéntica en la que el correspondiente isómero *cis* es el producto ligeramente mayoritario (57.5%) frente al correspondiente isómero *trans* (42.5%) (**Esquema 37**).<sup>166</sup>



**Esquema 37**

Como ya hemos mencionado, es en este punto donde abordamos la separación de los isómeros, sometiendo el crudo de reacción a cromatografía en columna sobre gel de sílice, usando como fase móvil Hexano/AcOEt (4:1), eluyendo en primer lugar los derivados dipropargilados, isómero *cis* primero y posteriormente el isómero *trans*, y en segundo lugar los derivados monopropargilados, de nuevo el isómero *cis* eluye antes que el isómero *trans*.

<sup>166</sup> Guillon, J.; Hébert, G.; Dallemagne, P.; Léger, J. M.; Vidaillac, C.; Thé, C.; Lisowski, V.; Rault, S.; Demotes-Mainard, J.; Jarry, C. *J. Enz. Inh. Med. Chem.* **2003**, *18* (2), 147.

### 3.1.3. Acetilación y benzoilación de los derivados 92a y 92b

La acilación de grupos funcionales como alcoholes o aminas es una de las transformaciones más frecuentes y sencillas en síntesis orgánica, ya que proporciona un método barato y eficiente para la protección de grupos hidroxilo y amino, en un proceso de síntesis de varios pasos.<sup>167</sup>

La acilación es llevada a cabo, generalmente, por tratamiento con un cloruro de acilo o con un anhídrido de ácido, en presencia de un catalizador ácido o básico, en un disolvente orgánico adecuado.

Como anhídrido de ácido el más usado es el anhídrido acético ya que es el menos tóxico, las bases catalizadoras más eficaces son el DMAP (4-dimetilaminopiridina) y las fosfinas, y como ácidos catalizadores más potentes nos encontramos el  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{TaCl}_5$ ,  $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ ,  $\text{Me}_3\text{SiOTf}$ ,  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ ,  $\text{In}(\text{OTf})_3$ ,  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ ,  $\text{LiClO}_4$ . Los disolventes escogidos para estas reacciones suelen ser  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeCN y THF (tetrahidrofurano).<sup>168</sup>

Uno de los métodos más comunes para la introducción de grupos acetato es el uso de  $\text{Ac}_2\text{O}$  (anhídrido acético) en piridina a 20°C durante 12 horas.<sup>169</sup>

Al realizar la reacción a temperaturas menores favorecemos la acetilación de alcoholes primarios frente a secundarios.<sup>170</sup> Los alcoholes terciarios no son acetilados bajo estas condiciones.

En 1969, Sterglic y Hofle introdujeron el uso del DMAP como catalizador, incrementando en  $10^4$  la relación de acetilación. Además, estas condiciones son útiles para una gran variedad de alcoholes, incluyendo los alcoholes terciarios.<sup>171</sup>

Propusieron entonces un método en el que se utiliza tanto el  $\text{Ac}_2\text{O}$  como el  $\text{AcCl}$ , en piridina, usando una cantidad catalítica de DMAP y poniendo la reacción en un rango de temperatura entre 24-80°C durante 1-40 horas.

En nuestro caso concreto hemos preparado los correspondientes derivados acetilados por reacción del alcohol con anhídrido acético, una cantidad catalítica de DMAP y  $\text{Et}_3\text{N}$  utilizando como disolvente MeCN. La  $\text{Et}_3\text{N}$  se utiliza en este caso como una base auxiliar.<sup>172</sup>

---

<sup>167</sup> Heravi, M. M.; Bakhtiari, K.; Javadi, N. M.; Oskooie, H. A.; Bamoharram, F. F. *Monatshefte für Chemie* **2007**, 138, 445.

<sup>168</sup> Ranu, B. C.; Dey, S. S.; Hajra, A. *Green Chem.* **2003**, 5, 44

<sup>169</sup> Zhdanov, R. I.; Zhenodarova, S. P. *Synthesis* **1975**, 222.

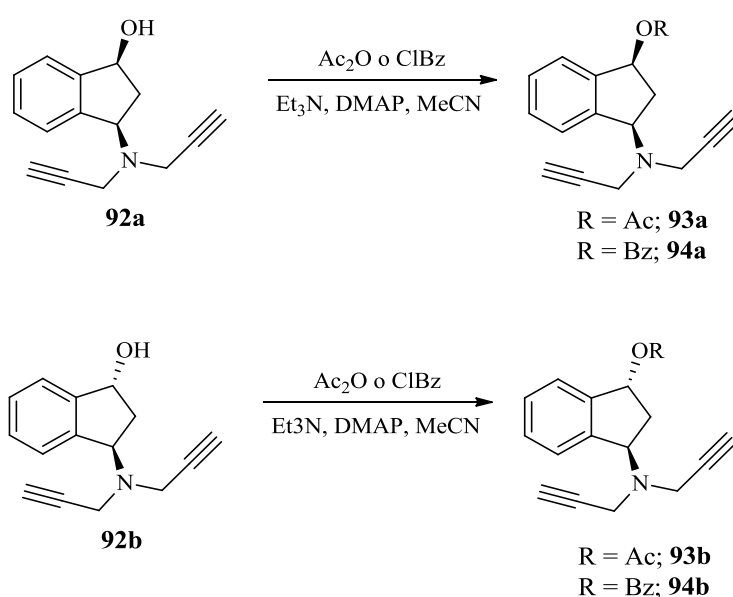
<sup>170</sup> Weber, H.; Khorana, H. G. *J. Mol. Biol.* **1972**, 72, 219.

<sup>171</sup> a) Sterglic, W.; Hofle, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, 8, 981. b) Vorbruggen, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, 17, 569.

<sup>172</sup> Xu, S.; Held, I.; Kempf, B.; Mayr, H.; Steglich, W.; Zipse, H. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11 (16), 4751.

Para la preparación de los derivados benzoilados hemos optado por el mismo procedimiento sintético, haciendo reaccionar los alcoholes correspondientes con cloruro de benzoilo, una cantidad catalítica de DMAP y Et<sub>3</sub>N en MeCN.

Así y a partir del derivado dipropargilado *cis* (**92a**) se obtuvieron los derivados acetilado **93a** y benzoilado **94a** con rendimientos del 96% y 65% respectivamente. De igual manera y a partir del derivado dipropargilado *trans* (**92b**) se prepararon sus derivados acetilado **93b** y benzoilado **94b** con rendimientos del 67% y 65% respectivamente (**Esquema 38**).<sup>173</sup>



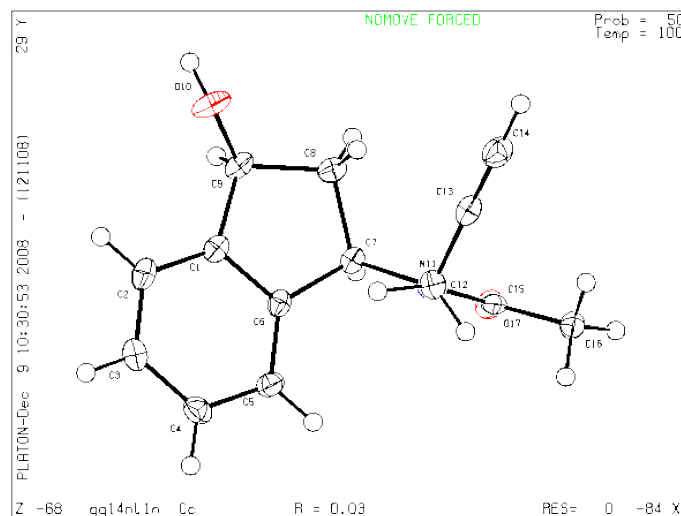
**Esquema 38**

A pesar de los diferentes ensayos realizados en los que hemos variado los agentes acilantes y las condiciones de reacción, no hemos conseguido introducir los grupos acetilo y benzoilo en el grupo hidroxilo de los derivados monopropargilados **91a** y **91b**, ya que en todos los casos el proceso de acilación se realiza preferentemente sobre el átomo de nitrógeno.

Así por ejemplo cuando hemos hecho reaccionar el derivado *cis* **91a** con un equivalente de Ac<sub>2</sub>O, una cantidad catalítica de DMAP y Et<sub>3</sub>N utilizando como disolvente MeCN hemos obtenido única y exclusivamente el derivado *N*-acetilado, **121**, cuya estructura hemos verificado mediante difracción de rayos X (**Figura 13**).<sup>174</sup>

<sup>173</sup> Furuta, K.; Gao, Q.; Yamamoto, H. *Org. Syn.* **1995**, 72, 86.

<sup>174</sup> Los datos cristalográficos del derivado *N*-acetilado **121** han sido depositados en el Cambridge Crystallographic Data Center como supplementary publication con el número CCDC 863147. Copia de dichos datos pueden ser obtenidos gratuitamente solicitándolos a CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.



**Figura 13. Diagrama ORTEP del derivado *N*-acetilado 121.**

Una vez preparados los diferentes derivados de la rasagilina inicialmente previstos, 3-hidroximono- y 3-hidroxidipropargilado, isómeros *cis* y *trans*, así como los correspondientes acetatos y benzoatos de los derivados dipropargilados nos pareció de interés, al objeto de evaluar la importancia de un mayor nivel de oxidación de la función existente en la posición 3 del anillo de indano, sintetizar los correspondientes derivados mono- y dipropargilado de la indanona. Para ello decidimos usar como compuesto precursor la aminocetona **89**, que como hemos indicado anteriormente ya habíamos preparado.

### 3.1.4. Síntesis de los derivados de 3-amino-1-indanona **97** y **98**

La hidrólisis del grupo protector de la función amina se puede llevar a cabo por tratamiento con ácido clorhídrico, formándose el correspondiente cloruro de amonio que libera la amina en medio alcalino,<sup>345</sup> sin afectación del grupo carbonilo.

Por ello nosotros partiendo del compuesto **89** y por reacción con ácido clorhídrico a reflujo<sup>175</sup> obtuvimos el cloruro de ácido **95** con un rendimiento del 95%, el cual por tratamiento con la resina de intercambio iónico Amberlita IRA-400 permitió obtener la correspondiente aminocetona **96** con un rendimiento del 64%.

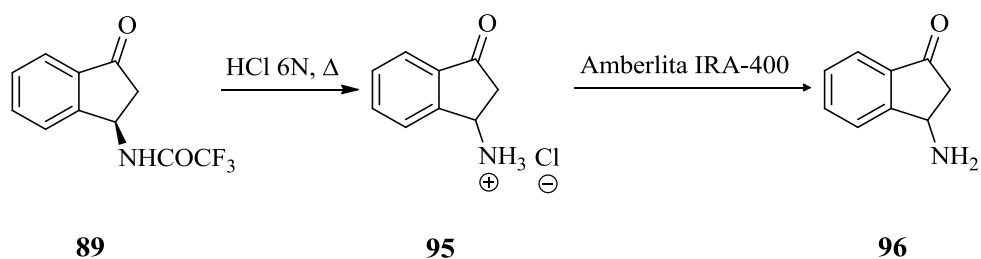
Existen datos bibliográficos que describen aminas similares a la **96** como compuestos inestables que solo se pueden obtener en su forma de clorhidrato.<sup>176,177</sup>

<sup>175</sup> Rault, S.; Dallemagne, P.; Robba, M. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1987**, 6, 1079.

<sup>176</sup> Dallemagne, P.; Boulouard, M.; Rault, S.; Robba, M. *J. Heterocyclic Chem.* **1993**, 30, 799.

<sup>177</sup> Dallemagne, P.; Rault, S.; Cugnon de Sevicourt, M.; Hassan, K. H.; Robba, M. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 23, 2607

Sin embargo, en nuestro caso se trata de un compuesto estable. El procedimiento sintético planteado para la preparación de este tipo de derivados es el presentado en el **esquema 39**:



**Esquema 39**

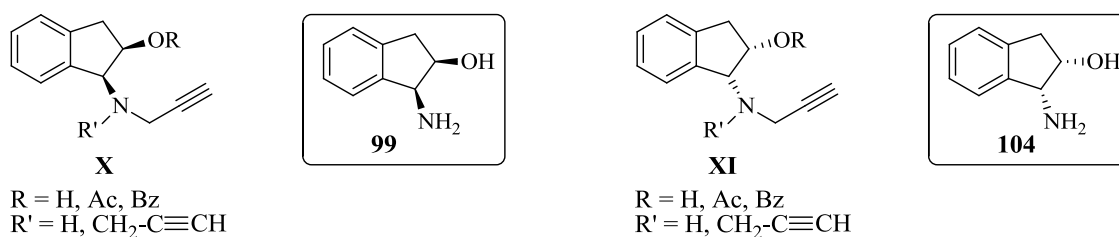
Una vez en disposición de la aminocetona **96** procedimos a realizar la propargilación sobre ésta, utilizando la metodología descrita anteriormente, obteniendo los derivados **97** y **98**.

En este caso la reacción de propargilación, contrariamente a lo ocurrido en el proceso de propargilación de los aminoalcoholers **84a** y **84b** (véase apartado **3.1.2.**) en el que se obtenían mayoritariamente los derivados dipropargilados, proporciona una mezcla casi idéntica de los derivados mono- y dipropargilados, **97** y **98**, respectivamente (**97/98**- 52.2/47.8).

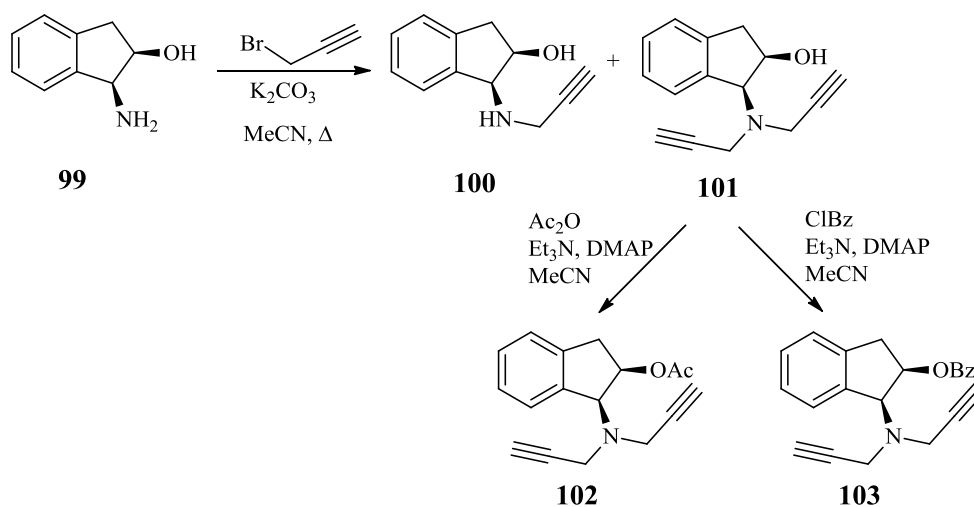
### 3.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE RASAGILINA SUSTITUIDOS EN LA POSICIÓN 2 (X y XI)

Finalizada la preparación de los derivados de rasagilina funcionalizados en la posición 3, nos ha parecido de interés preparar nuevos derivados de la misma funcionalizados en la posición 2 del anillo de indano, **X** y **XI**

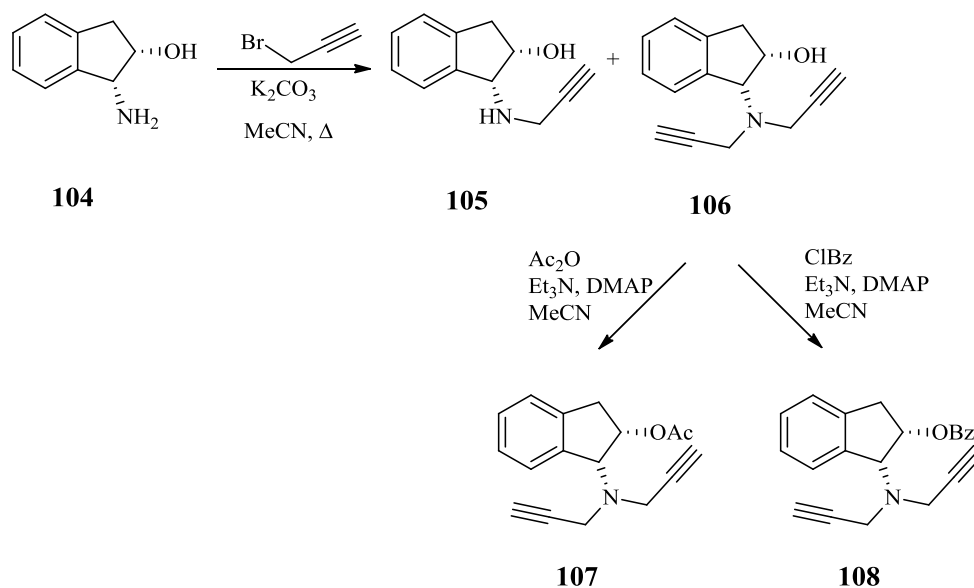
Para la preparación de estos derivados **X** y **XI** utilizaremos los aminoalcoholes comerciales (1*S*,2*R*)-(-)-*cis*-1-amino-2-indanol, **99**, y (1*R*,2*S*)-(+)-*cis*-1-amino-2-indanol **104** respectivamente, sobre los que realizaremos la propargilación, obteniendo así, los derivados mono- y dipropargilados, **100** y **101** partiendo de **99** o **105** y **106** partiendo de **104**. Posteriormente llevaremos a cabo la acetilación y benzoilación sobre el derivado dipropargilado correspondiente aislándose los compuestos **102** y **103** para el caso de los derivados de tipo **X** y **107** y **108** en el caso de los derivados de tipo **XI**.



El procedimiento sintético que hemos seguido es el que se muestra en los **esquemas 40 y 41**:







Esquema 41

En este caso el procedimiento sintético a llevar a cabo se simplifica mucho debido a que los aminoalcoholes precursores **99** y **104** son comerciales. Sobre estos, hemos realizado directamente la propargilación empleando la metodología descrita anteriormente (véase apartado **3.1.2.**), utilizando 2 equivalentes del bromuro de propargilo, obteniendo los derivados mono- y dipropargilados, **100** y **101** en una proporción **100/101**- 34.6/65.4 y los correspondientes derivados **105** y **106** en una proporción **105/106**-31.6/68.4.

Como puede apreciarse el proceso de propargilación transcurre con resultados diferentes en función del sustrato sobre el que se realiza. Así en el caso de la propargilación de los aminoalcoholes **84a** y **84b** (tipo 1,3; véase apartado **3.1.2.**) el compuesto predominante es claramente el derivado dipropargilado, mientras que en el caso de los aminoalcoholes **99** y **104** aunque el producto principal continua siendo el derivado dipropargilado, se obtiene una mayor cantidad del derivado monopropargilado.

Si además analizamos los datos de la reacción de propargilación de la aminocetona **96** (véase apartado **3.1.4.**) vemos que en este caso se obtiene una mezcla casi idéntica de ambos derivados (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Porcentaje de productos obtenidos en los diferentes procesos de propargilación.**

Sustrato	% compuesto monopropargilado	% compuesto dipropargilado
<b>84a/84b</b>	15.5	84.5
<b>96</b>	52.2	47.8
<b>99</b>	34.6	65.4
<b>104</b>	31.6	68.4

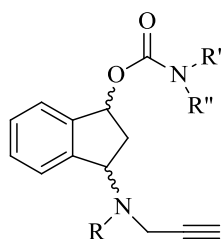
A continuación y por tratamiento del derivado dipropargilado **101** o **106**, según el caso, con anhídrido acético o cloruro de benzoilo en el seno de MeCN y en presencia de DMAP y Et<sub>3</sub>N hemos preparado el acetato **102** (80%) y el benzoato **103** (73%) en el caso de los derivados de tipo **X** y hemos preparado el acetato **107** (84%) y el benzoato **108** (60%) en el caso de los derivados de tipo **XI**.

De manera análoga a lo ocurrido con los derivados monopropargilados tipo 1,3 **91a** y **91b** (véase apartado **3.1.3.**) no hemos conseguido preparar sus correspondientes acetatos y benzoatos, ya en todos los intentos realizados siempre se ha formado el derivado *N*-acilado.

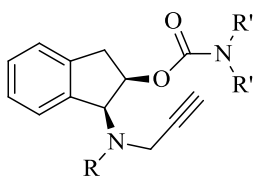
### 3.3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE LADOSTIGILO QUE PRESENTAN EL GRUPO CARBAMATO EN EL ANILLO DE CICLOPENTANO DEL INDANO

Como ya hemos comentado anteriormente (véase apartado 1.5.) el ladostigilo es un fármaco de acción dual que combina en la misma molécula el farmacóforo propargilamino de la rasagilina y el farmacóforo etilmetilcarbamato de la rivastigmina, lo cual se traduce en que presenta acción inhibitoria tanto sobre la MAO-B como sobre la *acetil y butirilcolinesterasa*, lo que lo convierte en un potencial candidato para el tratamiento de determinadas enfermedades neurodegenerativas.

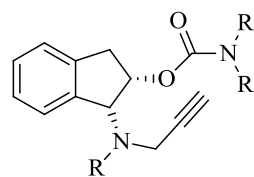
Por ello nos ha parecido de interés transformar los diferentes hidroxiderivados preparados por nosotros, tanto de tipo 1,3 (**XIV**) como de tipo 1,2 (**XV** y **XVI**), en carbamatoderivados, con el objetivo de sintetizar nuevos candidatos a fármacos con actividad dual del tipo de la presentada por el ladostigilo.



**XIII** R = H, CH<sub>2</sub>-C≡CH  
R' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
R'' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



**XIVa** R = H, CH<sub>2</sub>-C≡CH  
R' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
R'' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



**XIVb** R = H, CH<sub>2</sub>-C≡CH  
R' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
R'' = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

Estos compuestos presentan una serie de variaciones estructurales con respecto al ladostigilo:

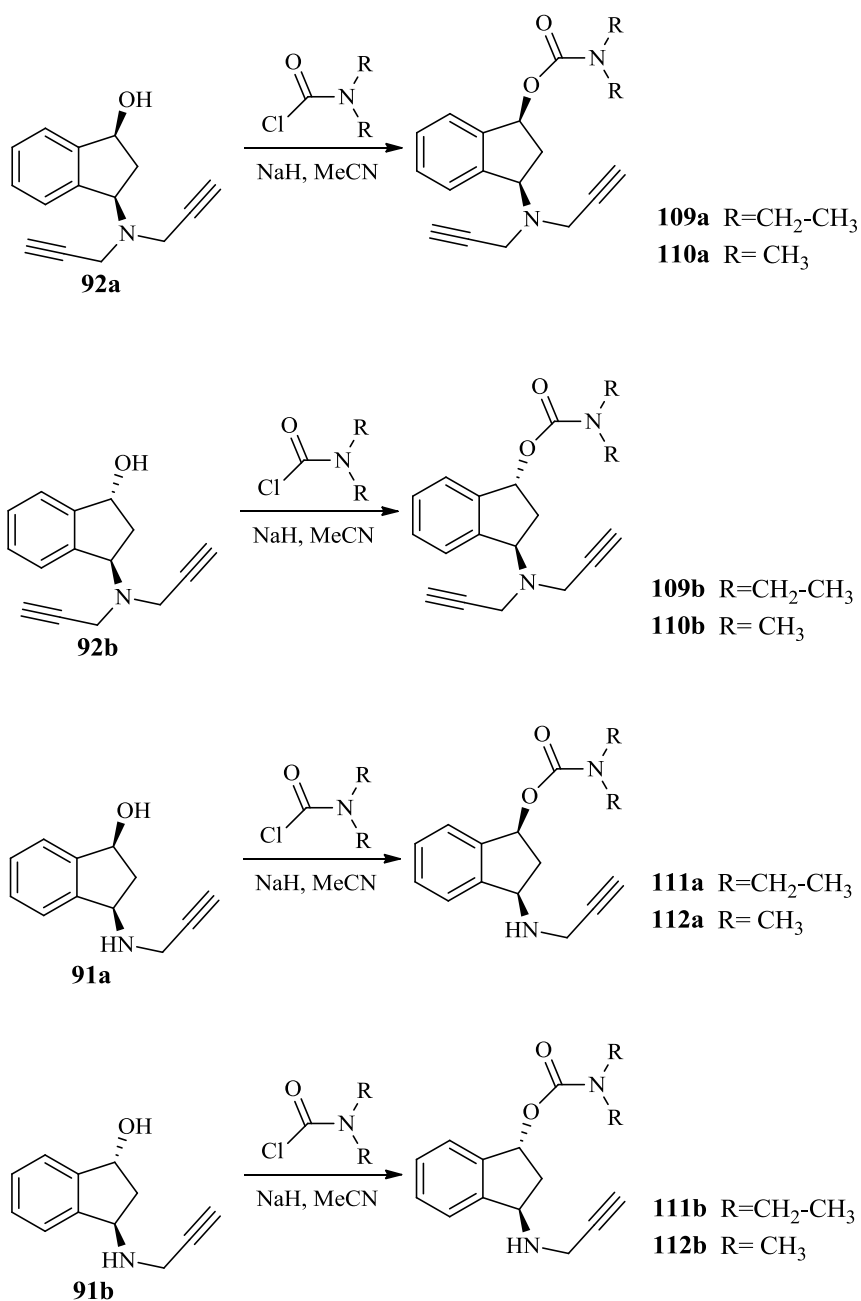
1. El agrupamiento carbamato situado en el ladostigilo en el anillo aromático se dispone ahora en el carbono 3 (**XIV**) y 2 (**XV** y **XVI**) del anillo de ciclopentano.
2. La estructura etilmetilcarbamato se reemplaza por estructuras dimetil o dietilcarbamato.
3. Los nuevos derivados pueden presentar uno o dos grupos propargilo sobre la fracción amino.

La introducción del agrupamiento carbamato se llevó a cabo, a partir del derivado mono- o dipropargilado adecuado, por tratamiento de éstos con el cloruro de dietil o dimetil carbamato, según el caso, en presencia de hidruro sódico y usando como disolvente acetonitrilo anhidro.<sup>264</sup>

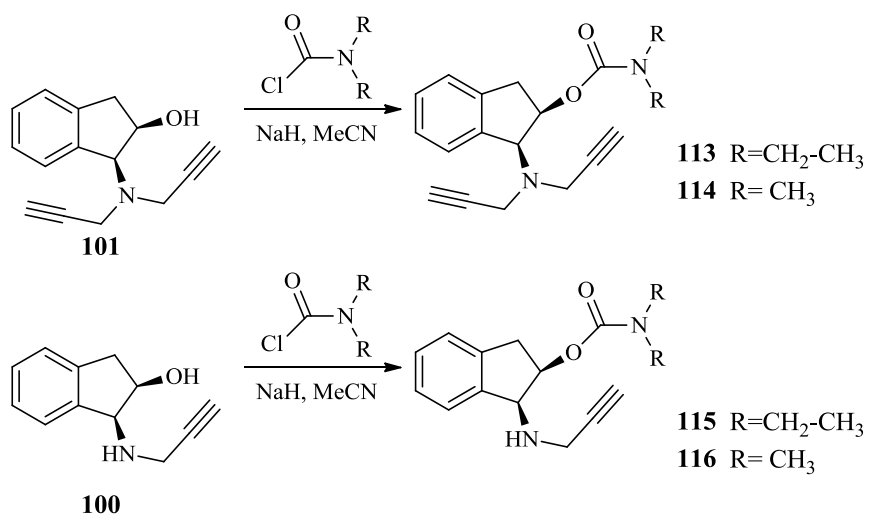
Al igual que en el caso de los derivados, **IX**, **X** y **XI** hemos decidido cubrir todas las posibilidades y para ello hemos sintetizado estos análogos, en su forma racémica, sustituidos en la posición 3 del anillo, donde la relación entre los sustituyentes de las posiciones 1 y 3 fueron

tanto de tipo *cis* como *trans* (**XIV**) y sustituidos en la posición 2, en forma enantioméricamente pura (**XV** y **XVI**)

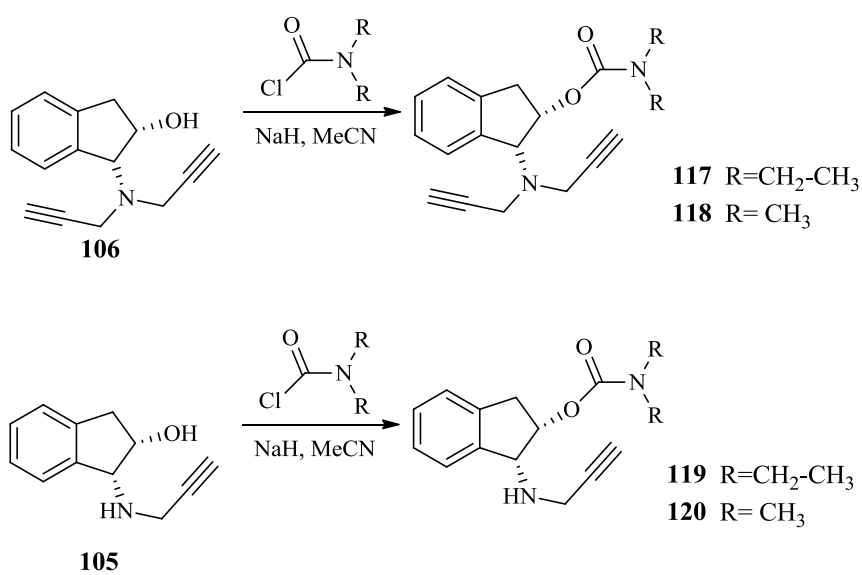
La preparación de estos derivados se llevó a cabo utilizando la metodología sintética que se muestra en los **esquemas 42, 43 y 44**:



**Esquema 42**



Esquema 43



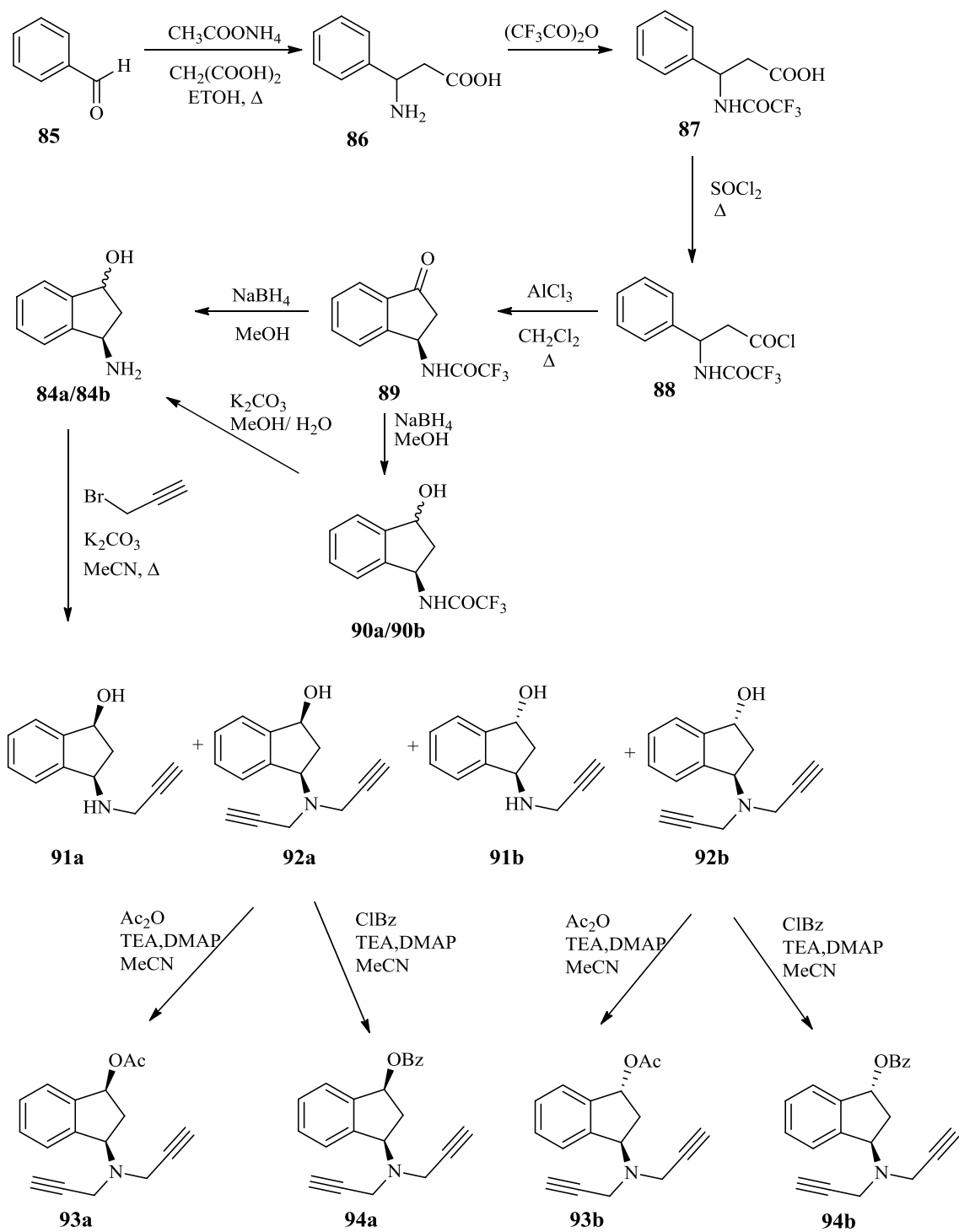
Esquema 44



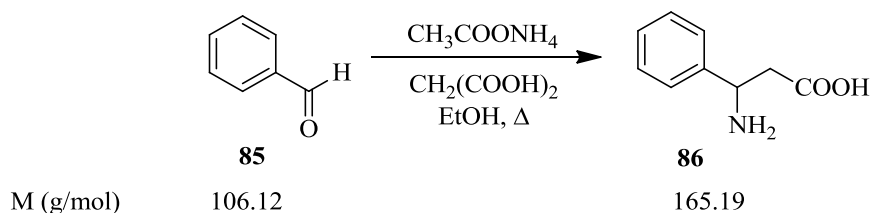
#### ***4. QUÍMICA: PARTE EXPERIMENTAL***







#### 4.1 Ácido (±)-3-amino-3-fenilpropanoico (86).



A una disolución de benzaldehído (15.00 g, 141.30 mmol) en EtOH (60 mL) se adicionó acetato amónico (21.90 g, 283 mmol) y ácido malónico (14.70 g, 141.30 mmol). La disolución resultante se reflujo a 82°C durante 15 horas. El precipitado formado se filtró a vacío y se lavó con EtOH caliente (3 × 20 mL), obteniéndose **86** (14.02 g, Rdto. 61%) como un sólido blanco.

**Compuesto 86:** Sólido blanco, p.f. 230-232°C.

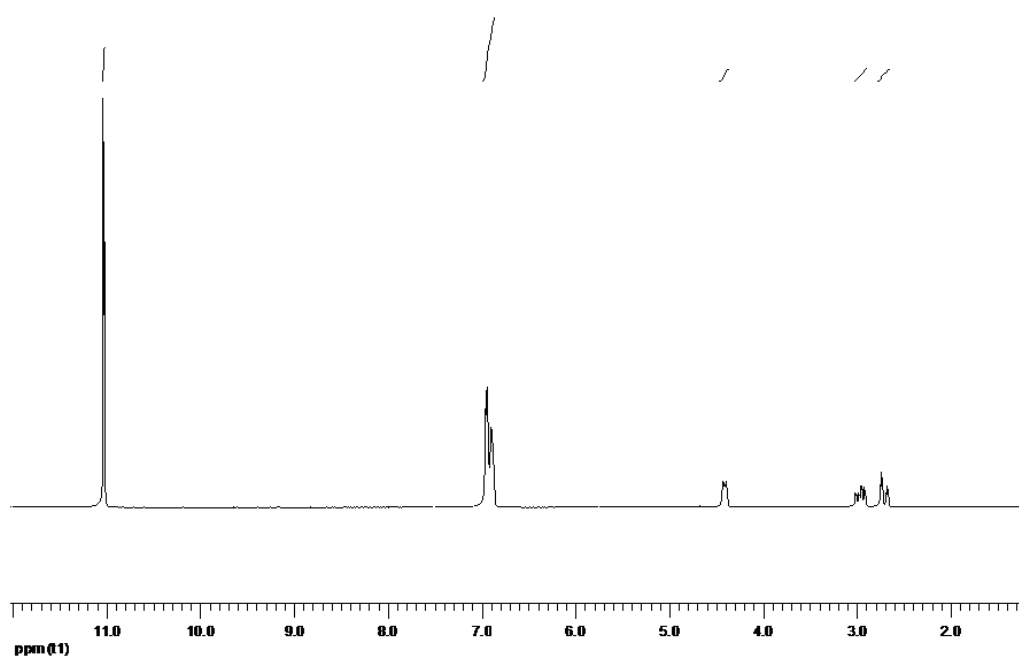
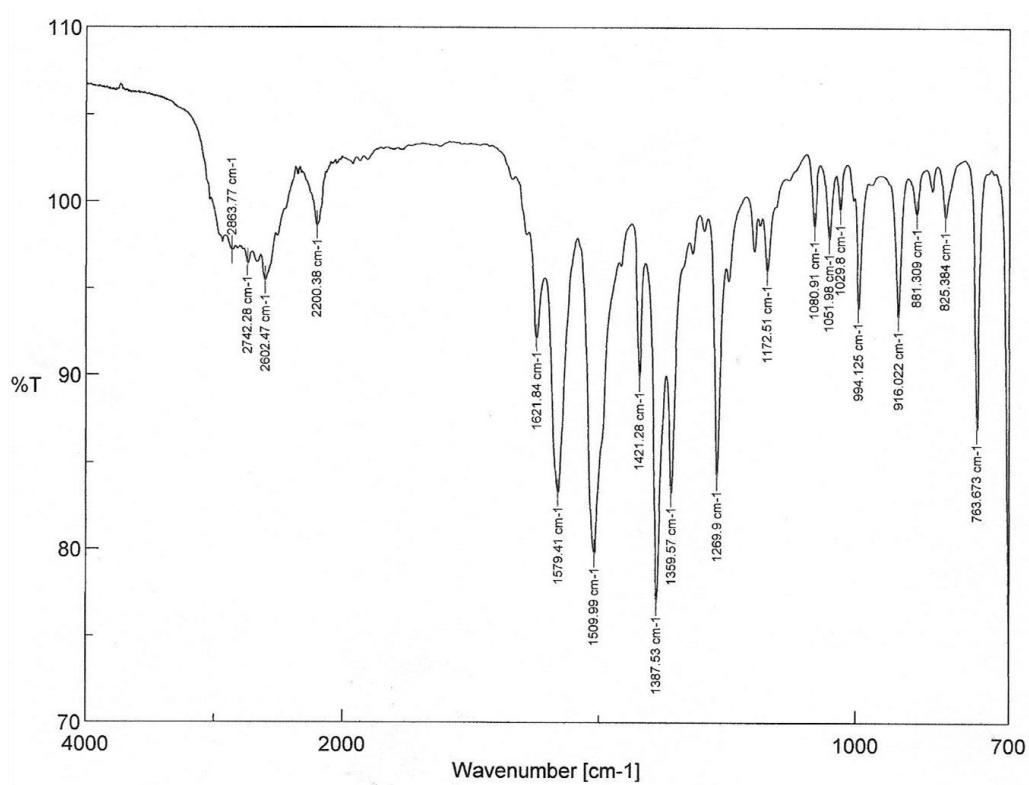
**IR**  $\nu$  = 2863, 1579, 1509, 1387, 1359  $\text{cm}^{-1}$ .

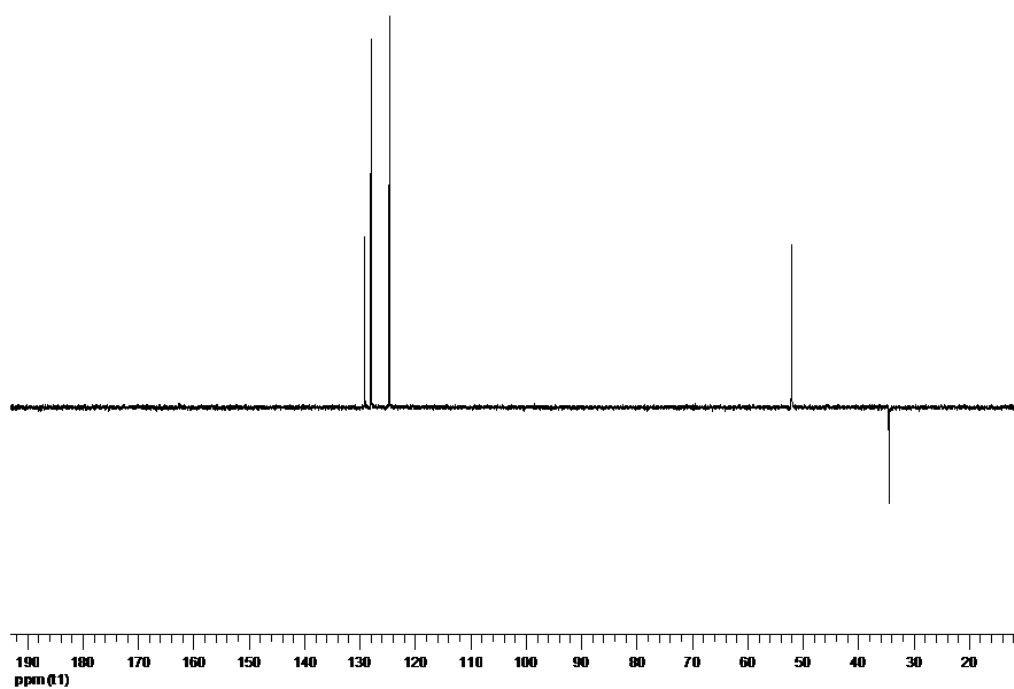
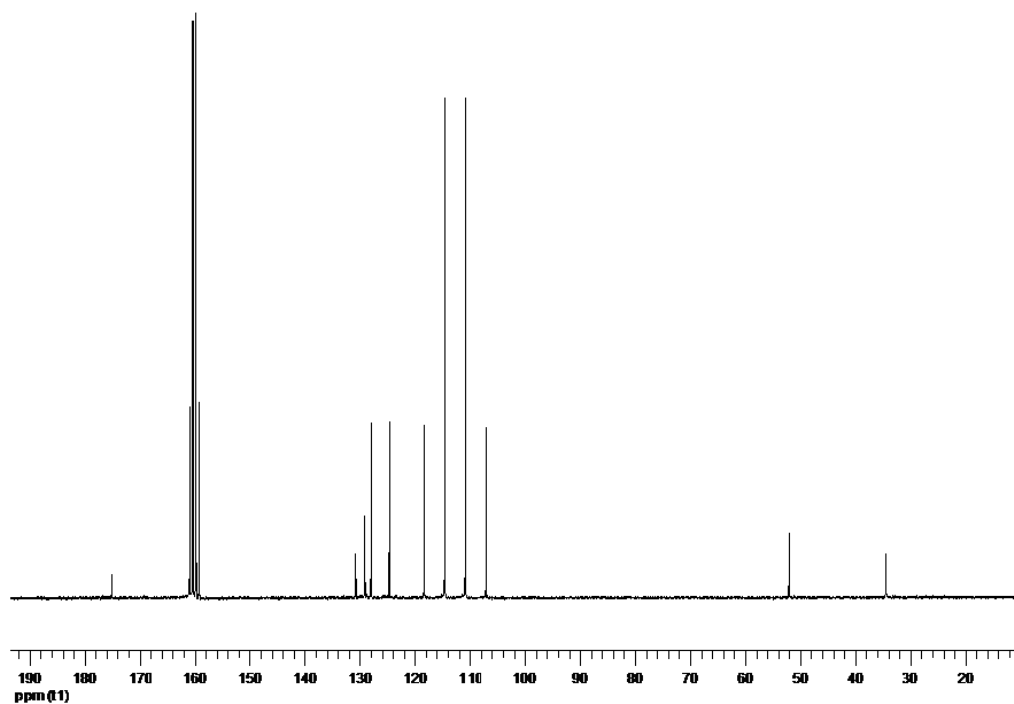
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, TFA-*d*)**  $\delta$  = 11.03 (d, 3H,  $J$  = 4.1 Hz, intercambian con  $\text{D}_2\text{O}$ , OH +  $\text{NH}_2$ ), 6.96-6.86 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 4.42-4.38 (m, 1H, CH), 2.95 (ddd, 1H,  $J$  = 18.4, 10.1, 3.4 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.70 (dd, 1H,  $J$  = 18.4, 3.8 Hz,  $\text{CH}_2$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, TFA-*d*)**  $\delta$  = 175.07 (CO), 130.68 (C), 129.02, 127.90 y 124.59 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 51.84 (CH), 34.27 ( $\text{CH}_2$ ).

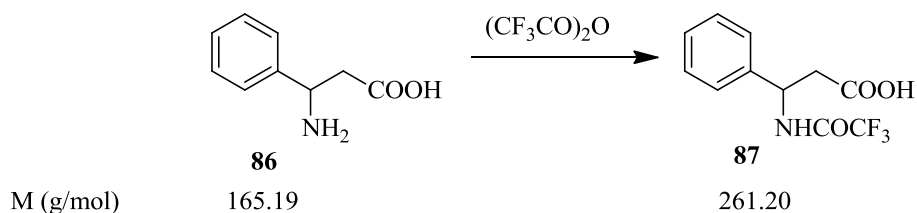
**EM (EI): m/z (%):** 165 (4) [ $\text{M}^+$ ], 164 (2) [ $\text{M}-1$ ] $^+$ , 119 (3) [ $\text{M}^+-\text{COOH}$ ], 106 (100) [ $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{COOH}$ ], 104 (17), 79 (34), 77 (22).

Análisis calculado para  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$  (165.19): C 65.44, H 6.71, N 8.48; encontrado. C 65.39, H 6.86, N 8.49.





#### 4.2. Ácido (±)-3-fenil-3-(2,2,2-trifluoroacetamido)propanoico (**87**).



Una disolución de **86** (4.00 g, 24.20 mmol) en anhídrido trifluoroacético (15 mL), bajo atmósfera de argón, se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras la evaporación del solvente y posterior trituración con  $\text{Et}_2\text{O}$ , el sólido blanco formado se lavó con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3  $\times$  15 mL), obteniéndose **87** (5.35 g, Rdto. 85%) como un sólido blanco.

**Compuesto 87:** Sólido blanco, p.f. 124-125°C.

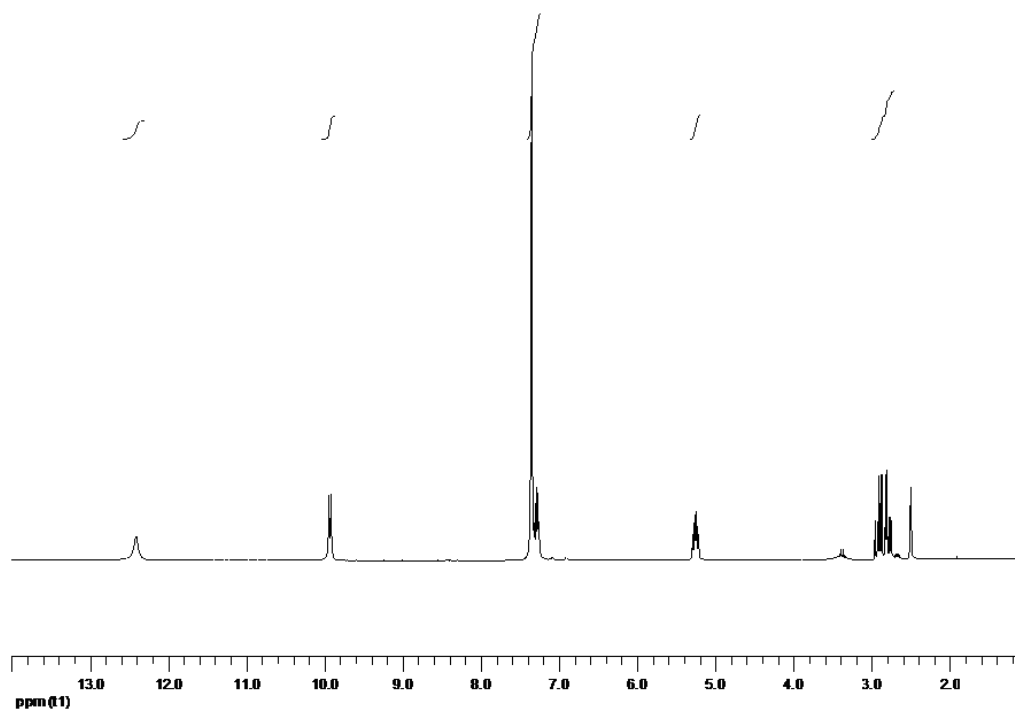
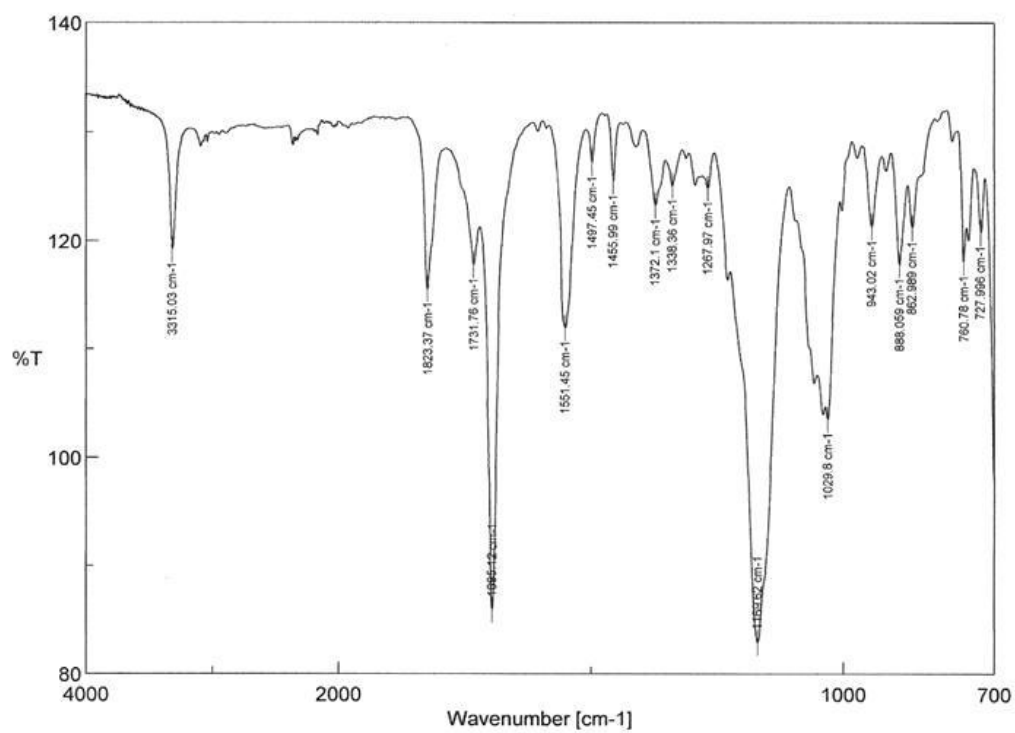
**IR  $\nu$**  = 3315, 1823, 1695, 1551, 1169, 1029  $\text{cm}^{-1}$ .

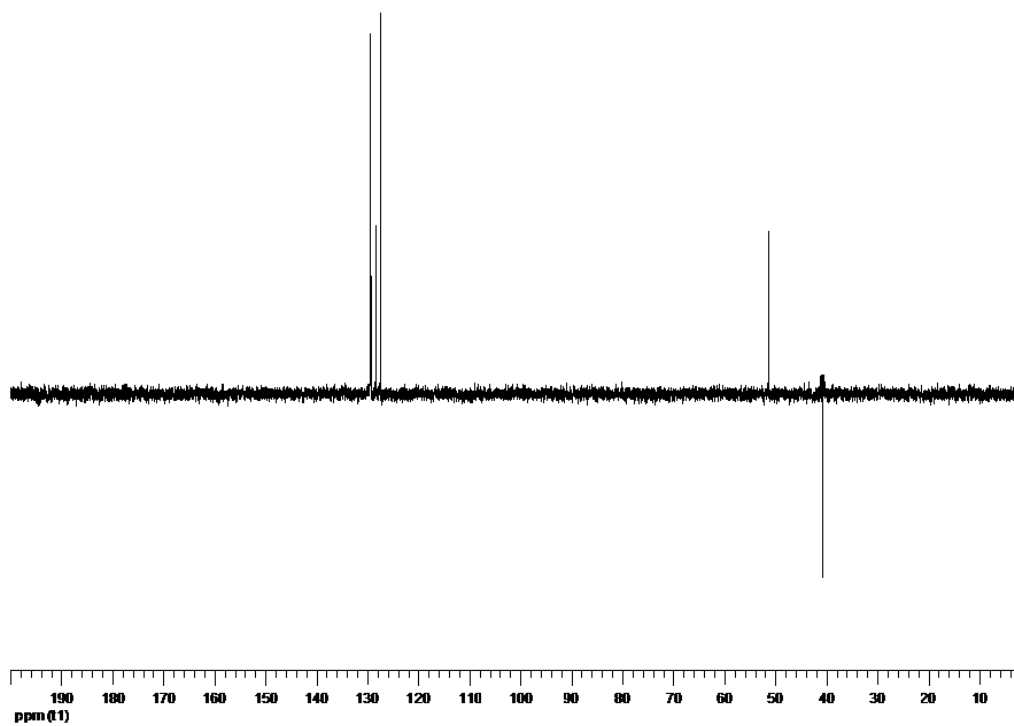
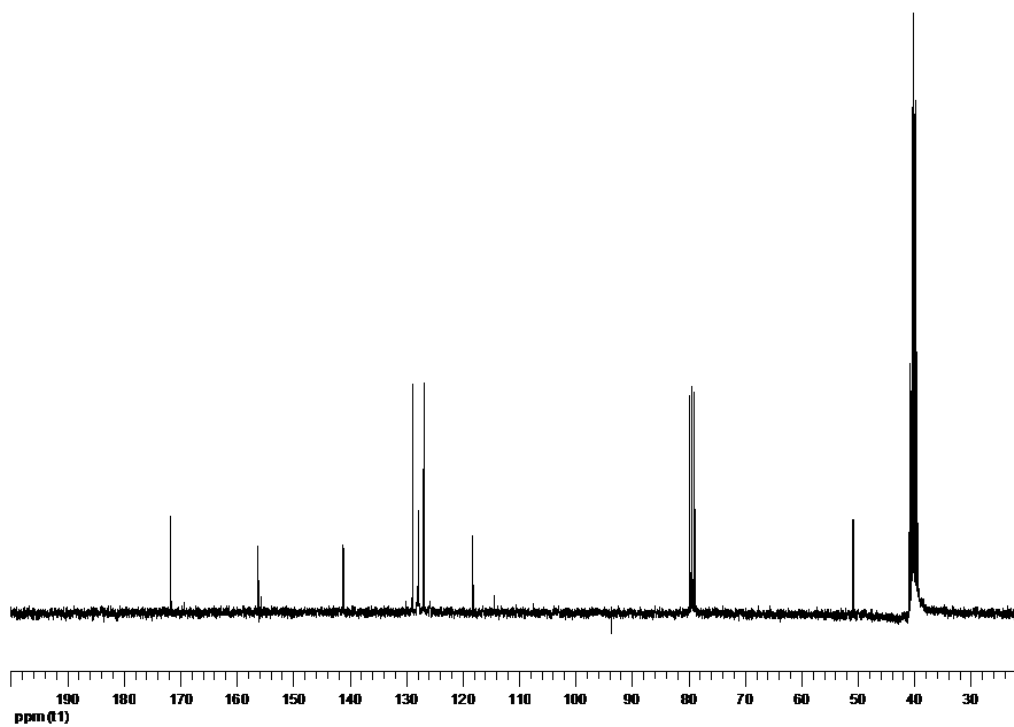
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d$ )  $\delta$**  = 12.41 (s. an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , COOH), 9.92 (d, 1H,  $J$  = 8.1 Hz, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH), 7.35-7.24 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.24 (dt, 1H,  $J$  = 8.8, 5.6 Hz, CH), 2.95-2.74 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB}$  = 16.2 Hz,  $J_{AM}$  = 9.4 Hz,  $J_{BM}$  = 5.7 Hz,  $\text{CH}_2$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d$ )  $\delta$**  = 171.65 (COOH), 156.15 ( $\text{COCF}_3$ ), 141.08 (C), 128.78, 127.81 y 126.81 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 118.14 ( $\text{COCF}_3$ ), 50.67 (CH), 40.05 ( $\text{CH}_2$ ).

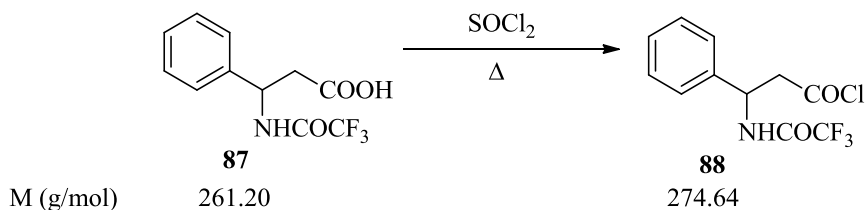
**EM (EI): m/z (%)**: 262 (4)  $[\text{M}+1]^+$ , 261 (3)  $[\text{M}^+]$ , 244 (12)  $[\text{M}^+-\text{OH}]$ , 215 (60)  $[\text{M}^+-\text{COOH}]$ , 202 (100)  $[\text{M}^+-\text{CH}_2\text{COOH}]$ , 132 (38), 104 (36), 77 (32).

Análisis calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NO}_3$  (261.20): C 50.58, H 3.86, N 5.36; encontrado C 50.43, H 4.02, N 5.39.





#### 4.3. Cloruro de (±)-3-fenil-3-(2,2,2-trifluoroacetamido)propanoilo (**88**).



Una disolución de **87** (3.0 g, 11.50 mmol) en cloruro de tionilo (15 mL) se reflujo a 82°C durante 24 horas. La mezcla resultante se evaporó a vacío y el crudo de reacción se trituro con ciclohexano, precipitando un sólido marrón que se filtró y lavó con ciclohexano (5 × 15 mL), obteniéndose **88** (3.15 g, Rdto. 98%) como un sólido amarillo.

**Compuesto 88:** Sólido amarillo, p.f. 60-62°C.

**IR**  $\nu$  = 3306, 1703, 1556, 1275, 1153  $\text{cm}^{-1}$ .

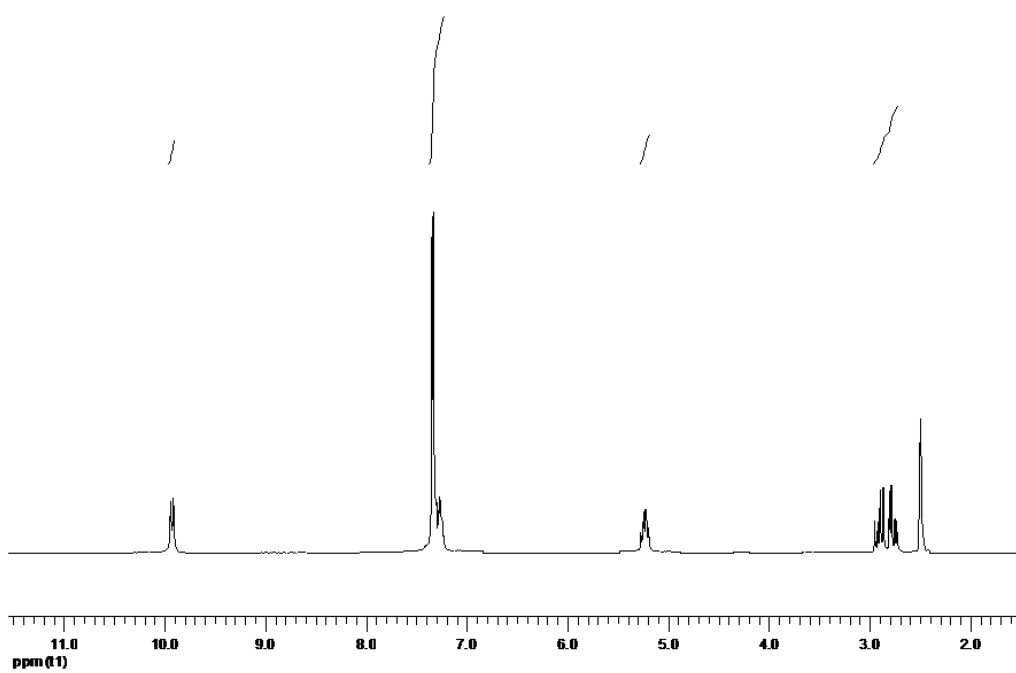
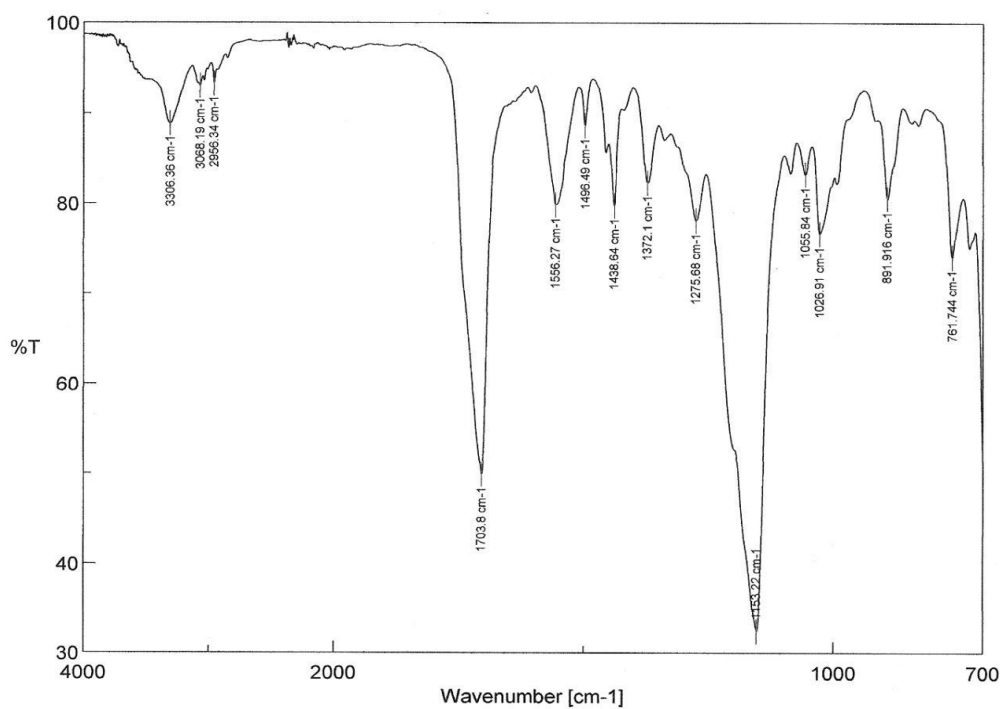
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta$  = 9.93 (d, 1H,  $J$  = 8.1 Hz, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH), 7.34-7.23 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.23 (dt, 1H,  $J$  = 8.8, 5.8 Hz, CH), ), 2.94-2.72 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB}$  = 16.3 Hz,  $J_{AM}$  = 9.4 Hz,  $J_{BM}$  = 5.6 Hz,  $\text{CH}_2$ ).

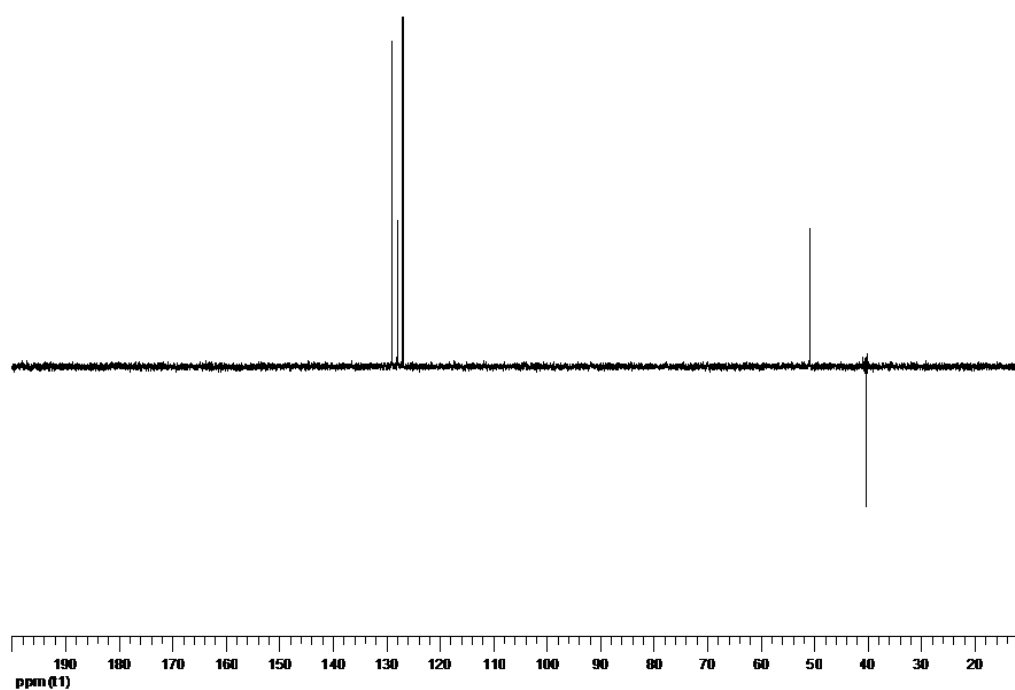
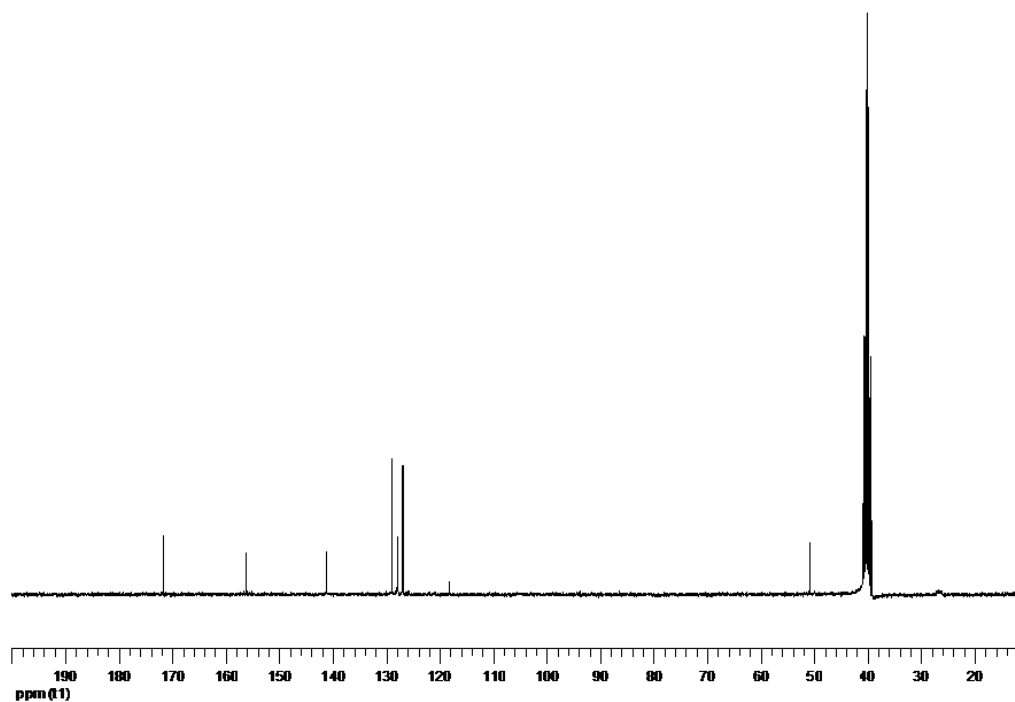
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta$  = 171.67 (COCl), 156.12 ( $\text{COCF}_3$ ), 141.14 (C), 128.88, 127.89 y 126.84 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 118.18 ( $\text{COCF}_3$ ), 50.69 (CH), 40.07 ( $\text{CH}_2$ ).

**EM (EI): m/z (%):** 261(5), 243 (7) [ $\text{M}^+ - \text{Cl}$ ], 215 (100) [ $\text{M}^+ - \text{COCl}$ ], 202 (32) [ $\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{COCl}$ ], 146 (24), 104 (40), 79 (43).

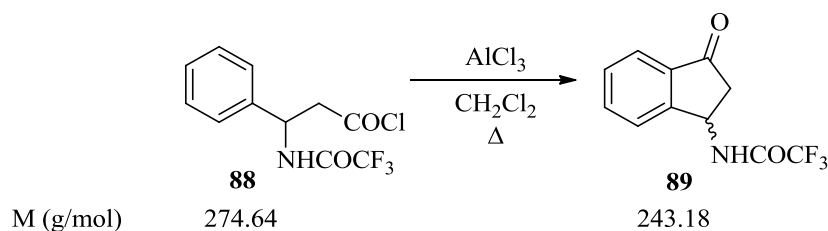
Análisis calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{ClF}_3\text{NO}_2$  (279.64): C 47.25, H 3.24, N 5.01; encontrado C 47.02, H 3.41, N 4.94.







**4.4. (±)-2,2,2-Trifluoro-N-(3-oxo-1H-1-indanil)acetamida (89).**



Una disolución de **88** (3.00 g, 10.80 mmol) en diclorometano (20 mL) se adicionó, gota a gota, sobre una disolución de  $\text{AlCl}_3$  (2.80 g, 21.40 mmol) en diclorometano (15 mL) bajo atmósfera de argón y a  $0^\circ\text{C}$  y se reflujo a  $42^\circ\text{C}$  durante 24 horas. A continuación se eliminó el exceso de disolvente por rotación a vacío, obteniéndose un sólido marrón que se trituro con  $\text{H}_2\text{O}$ , se filtró a vacío y se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  ( $3 \times 30$  mL). Posteriormente, el sólido aislado se dispersó en  $\text{Et}_2\text{O}$  (30 mL) y se extrajo con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  ( $5 \times 20$  mL). Las fases orgánicas resultantes se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y rotaron a vacío para eliminar el exceso de disolvente, obteniéndose **89** (1.60 g, Rdto. 62%) como un sólido blanco.

**Compuesto 89:** Sólido blanco, p.f.  $121\text{--}123^\circ\text{C}$ .

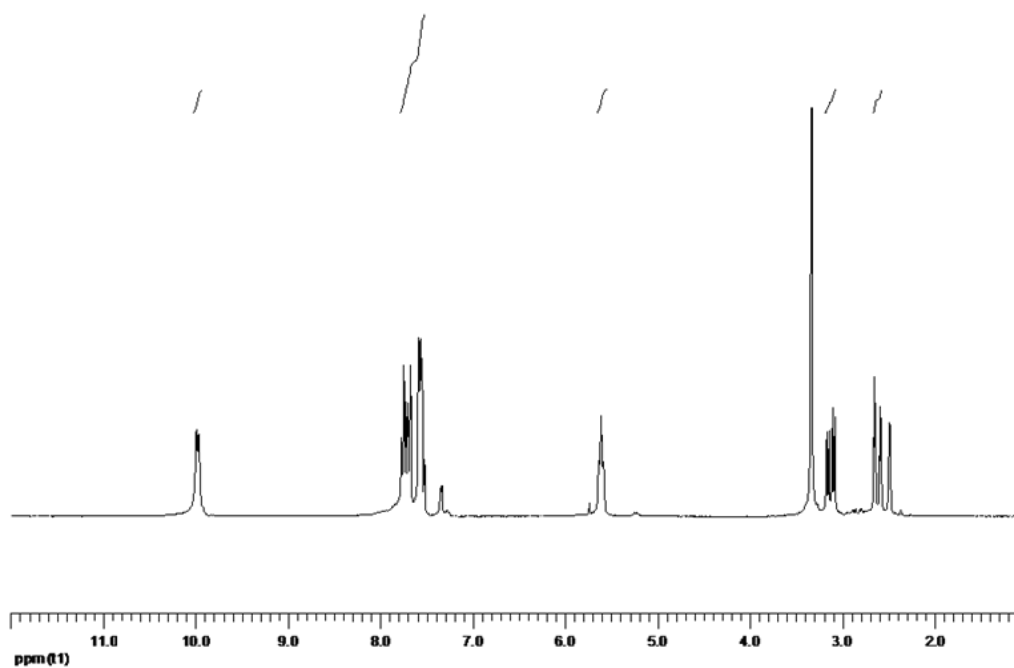
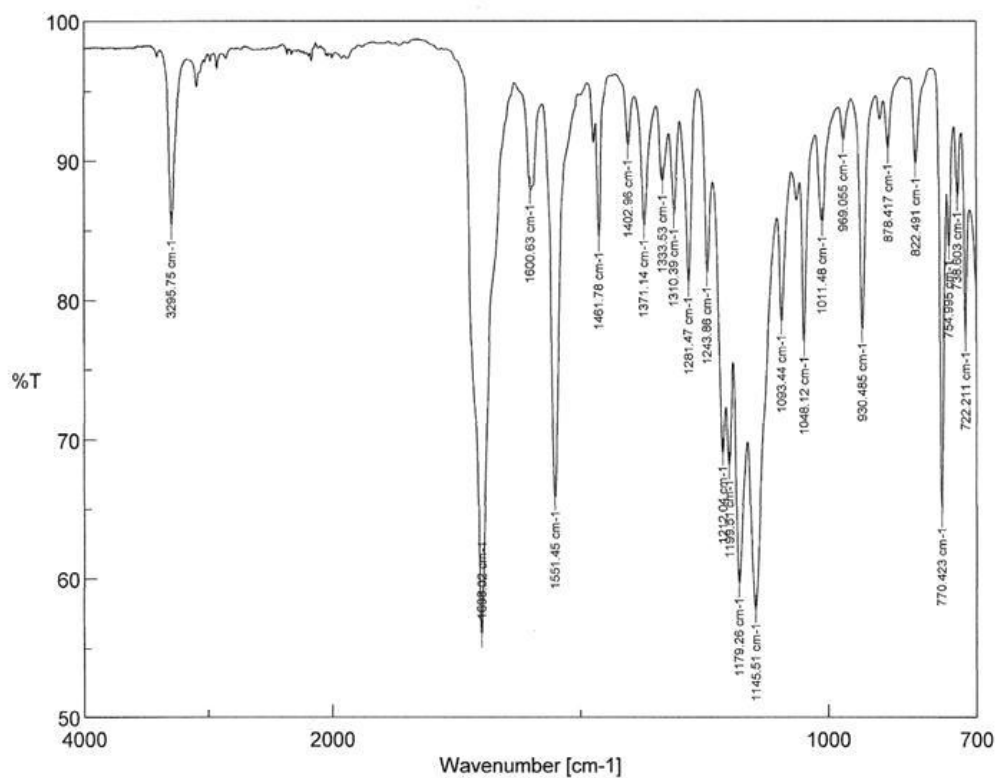
**IR  $\nu$**  = 3295, 1698, 1551, 1145,  $770\text{ cm}^{-1}$ .

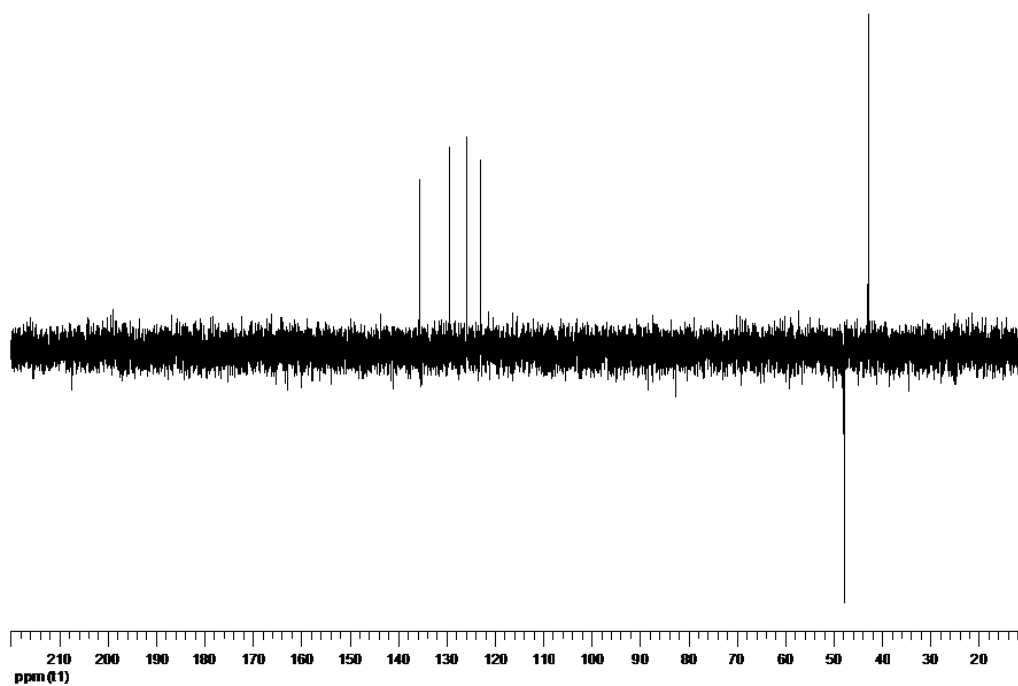
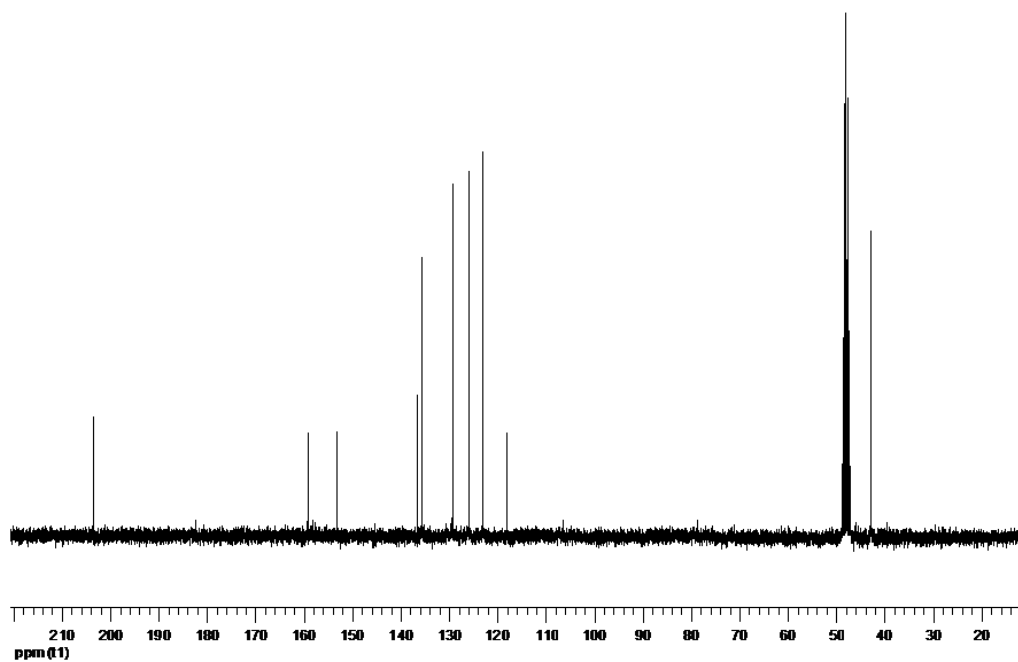
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO-}d$ )  $\delta$**  = 9.98 (d, 1H,  $J$  = 6.4 Hz, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH), 7.77-7.52 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.57 (t, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, 3-H), 3.12 (ddd, 1H,  $J$  = 18.7, 8.0, 2.5 Hz,  $2\alpha\text{-H}$ ), 2.61 (dt, 1H,  $J$  = 18.7, 3.3 Hz,  $2\beta\text{-H}$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO-}d$ )  $\delta$**  = 203.45 (CO), 159.15 ( $\text{COCF}_3$ ), 153.10 (C-3a), 136.44 (C-7a), 135.49, 129.20, 125.70 y 122.89 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 117.90 ( $\text{COCF}_3$ ), 47.64 ( $\text{CH}_2$ ), 42.67 (CH).

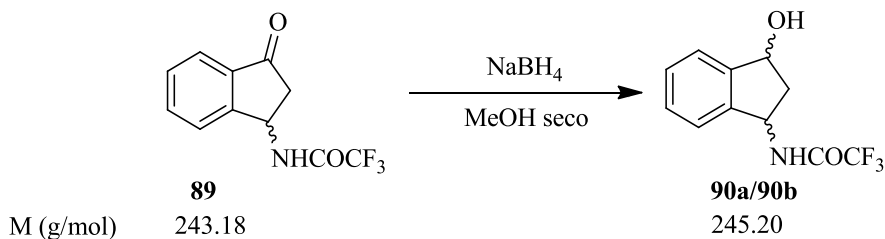
**EM (EI):  $m/z$  (%)**: 243 (43) [ $\text{M}^+$ ], 215 (100), 202 (30), 146 (47) [ $\text{M}^+ - \text{COCF}_3$ ], 104 (53), 77 (55).

Análisis calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_2$  (243.18): C 54.33, H 3.32, N 5.76; encontrado C 54.67, H 3.09, N 5.98.





**4.5. (±)-*cis* y (±)-*trans*-2,2,2-Trifluoro-N-(3-hidroxi-1-indanil)acetamida (90a/90b).**



Sobre una disolución de **89** (3.00 g; 12.3 mmol) en MeOH seco (15 mL), bajo atmósfera de argón, se adicionó a temperatura ambiente NaBH<sub>4</sub> (0.93 g; 24.60 mmol) en pequeñas porciones. Finalizada la adición, se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío, formándose un sólido que fue triturado con agua y extraído con Et<sub>2</sub>O (3 x 15 mL). Las fases orgánicas resultante se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el exceso de disolvente fue eliminado a vacío, obteniéndose un sólido blanco (2.33 g; Rdto. 77%) que fue identificado como la mezcla de compuestos **90a/90b** en una proporción *cis/trans* 60:40.

A efectos de identificación se somete una muestra del bruto (0.40 g) a cromatografía en columna sobre gel de sílice (12.60 g), empleando como eluyente Hex/Acetona 8:1, obteniéndose sucesivamente el compuesto (±)-*cis*-**90a** puro (0.150 g; 37%) y (±)-*trans*-**90b** puro (0.080 g; 20%).

**Compuesto 90a:** Sólido blanco, p.f. 150-151°C.

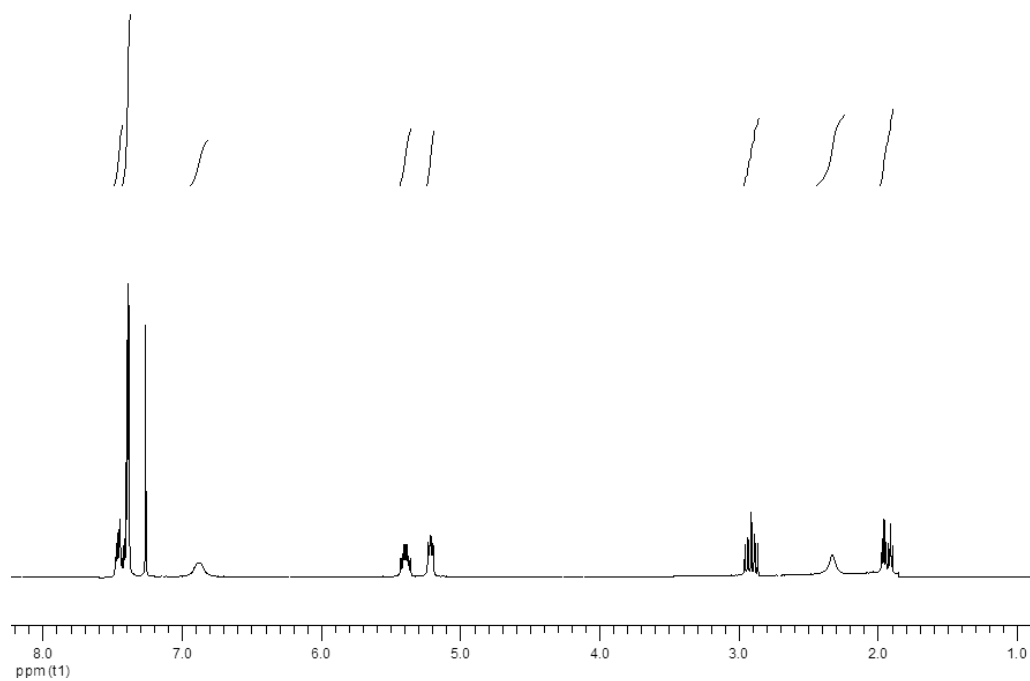
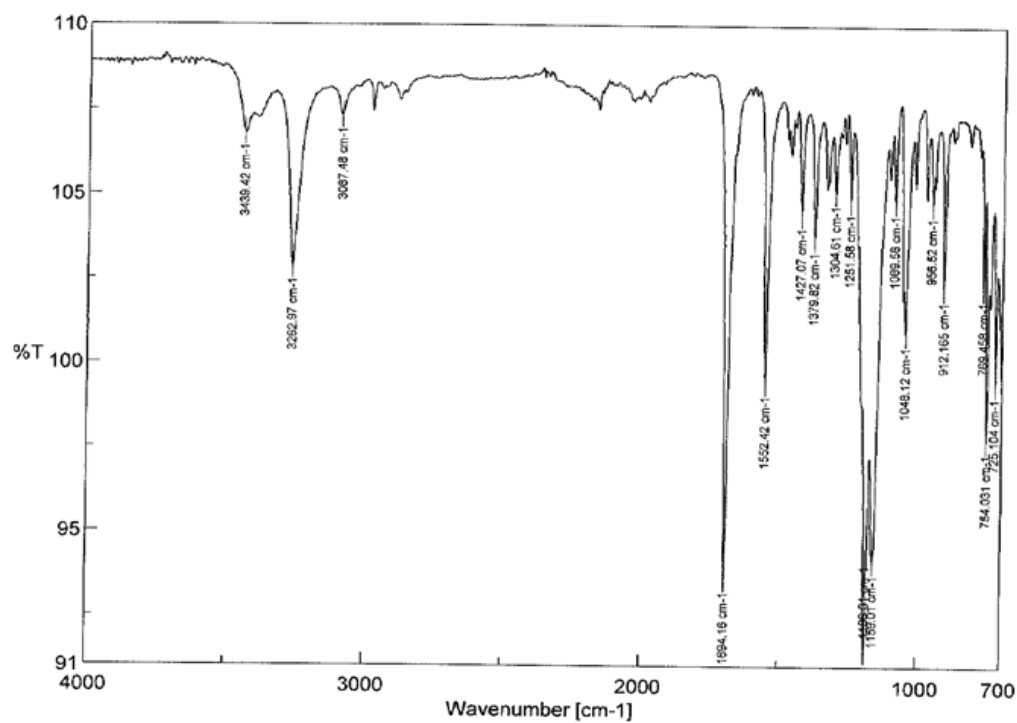
**IR**  $\nu$  = 3262, 1694, 1552, 1186, 1159, 754 cm<sup>-1</sup>.

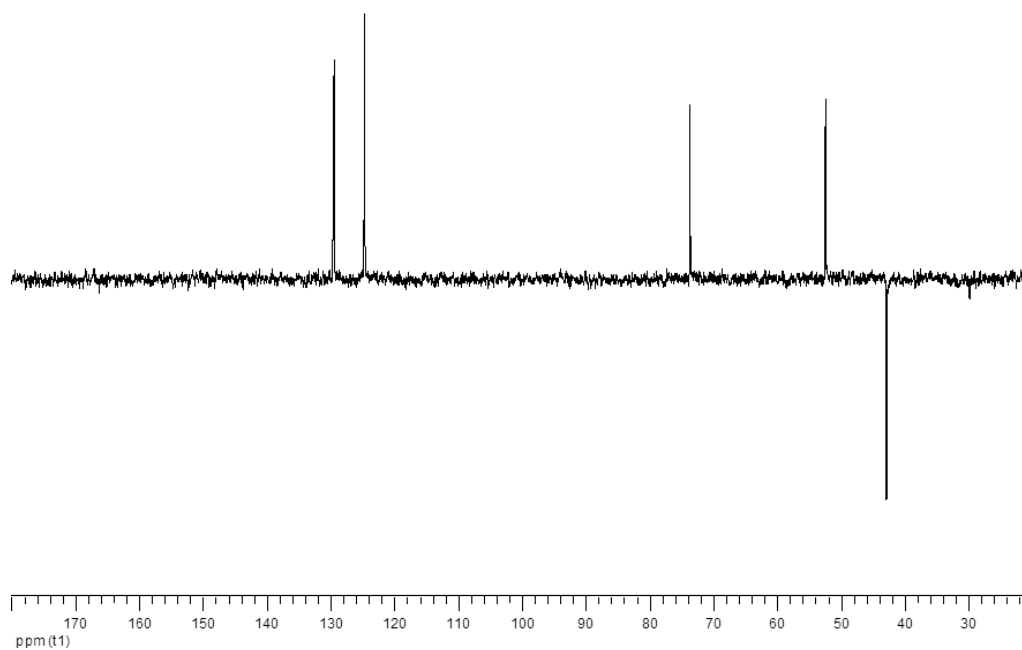
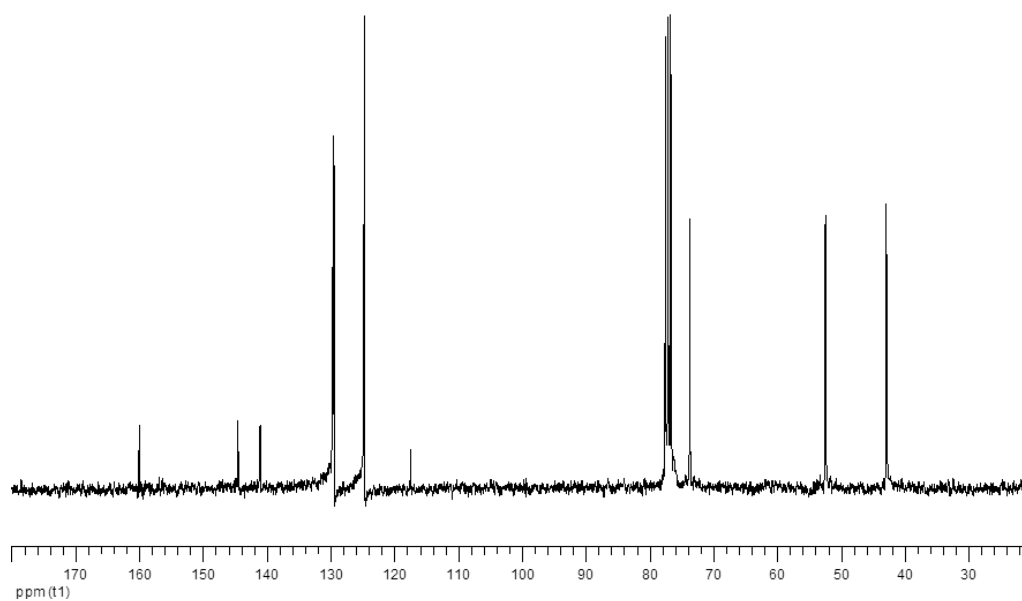
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*)**  $\delta$  = 7.47-7.38 (m, 4H, H<sub>arom</sub>), 6.80 (s. an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, NH), 5.39 (dt, 1H, *J* = 8.1, 4.5 Hz, 1-H), 5.2 (dd, 1H, *J* = 6.0, 4.0 Hz, 3-H), 2.90 (ddd, 1H, *J* = 13.9, 7.3, 6.5 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.02 (s. an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, OH), 1.93 (dt, 1H, *J* = 14.0, 4.1 Hz, 2 $\beta$ -H).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*)**  $\delta$  = 159.99 (C=O), 144.48 (C), 141.00 (C), 129.57, 129.40 y 124.68 (CH<sub>arom</sub>), 117.40 (C=O), 73.58 (C-3), 52.32 (C-1), 42.74 (CH<sub>2</sub>).

**EM (EI): m/z (%):** 227 (100) [M<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O], 179 (3), 157 (7), 132 (67) [M<sup>+</sup>-COF<sub>3</sub>], 115 (36), 103 (73), 77 (87).

Análisis calculado para C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> (245.07): C 53.88, H 4.11, N 5.71; encontrado C 54.01, H 4.02, N 5.83.







**Compuesto 90b:** Sólido blanco, p.f. 138-140°C.

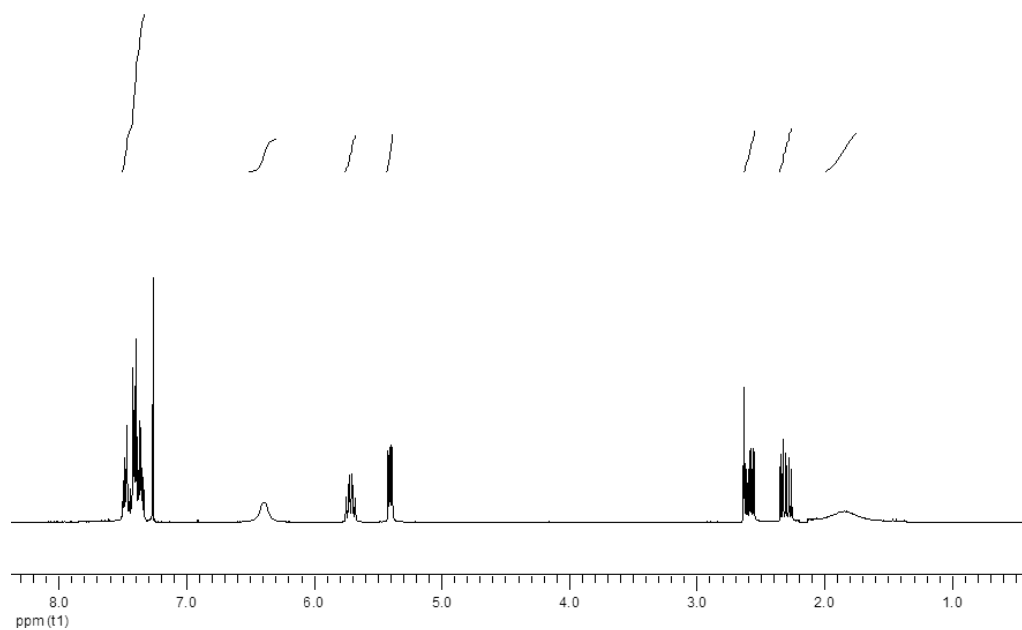
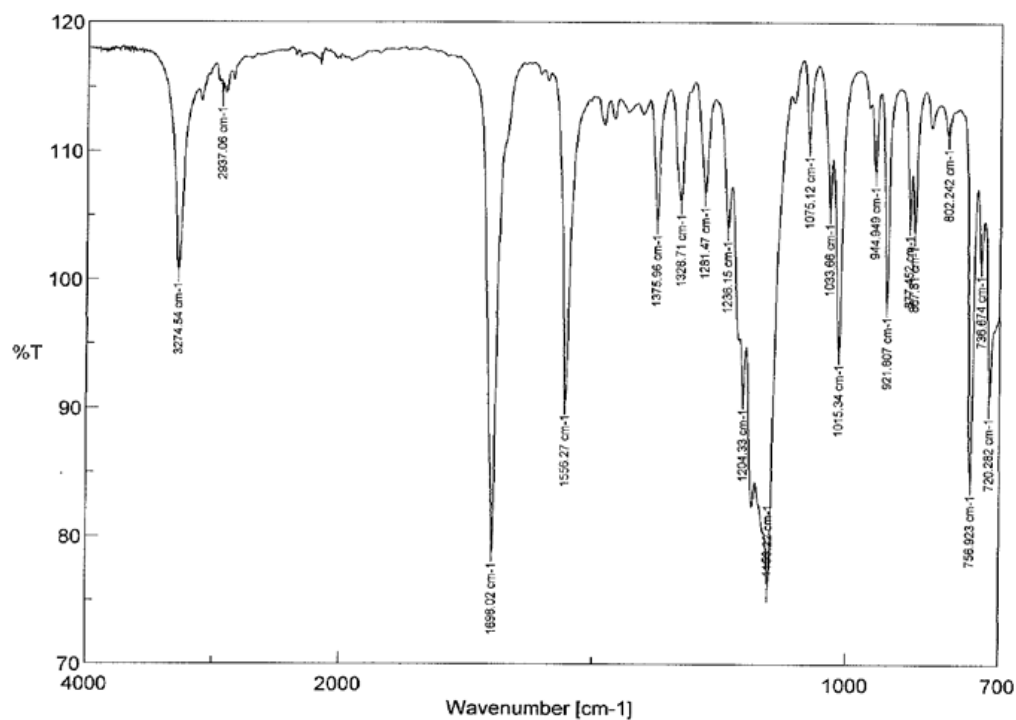
**IR  $\nu$**  = 3274, 1698, 1556, 1153, 756  $\text{cm}^{-1}$ .

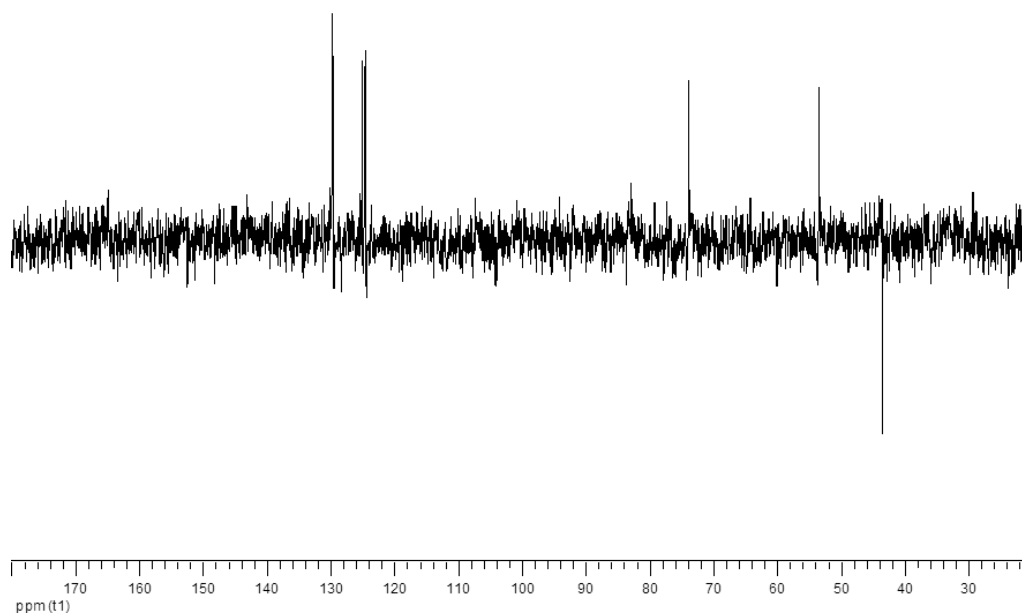
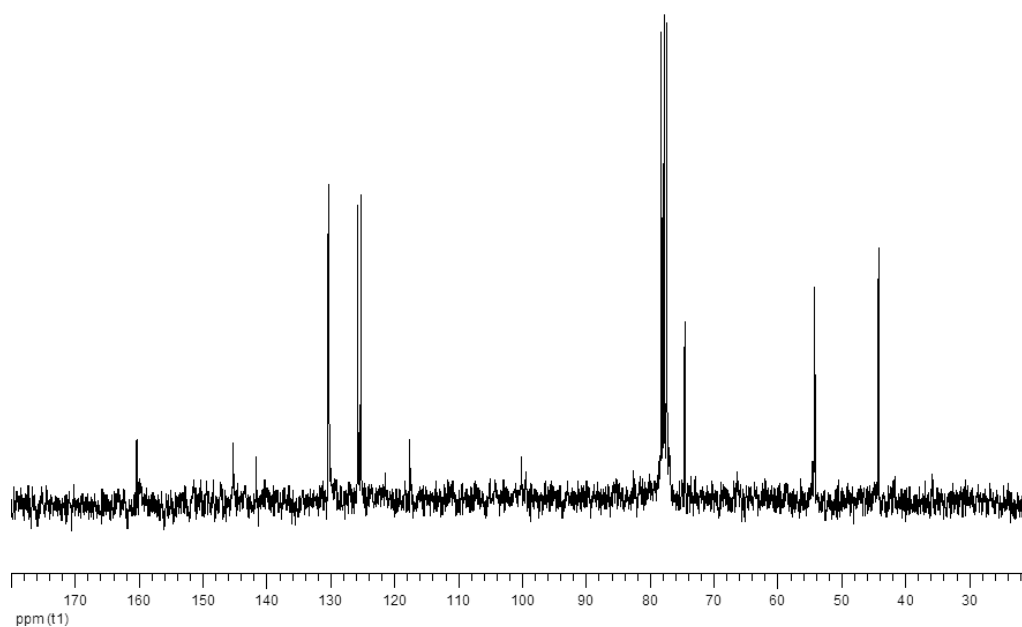
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ -*d*)  $\delta$**  = 7.50-7.33 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.38 (s. an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH), 5.71 (dd, 1H,  $J$  = 13.5, 7.9 Hz, 1-H), 5.40 (dd, 1H,  $J$  = 6.4, 3.5 Hz, 3-H), 2.54 (m, 1H, 2 $\alpha$ -H), 2.30 (ddd, 1H,  $J$  = 14.3, 5.8, 6.5 Hz, 2 $\beta$ -H), 1.85 (s. an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , OH).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ -*d*)  $\delta$**  = 160.30 ( $\text{C}=\text{OCF}_3$ ), 145.23 (C), 141.61 (C), 130.32, 130.20, 125.66 y 125.18 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 117.49 ( $\text{C}=\text{OCF}_3$ ), 74.41 (C-3), 54.02 (C-1), 44.03 ( $\text{CH}_2$ ).

**EM (EI):  $m/z$  (%):** 227 (1) [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ], 132 (100) [ $\text{M}^+ - \text{COCF}_3$ ], 115 (12), 103 (30), 77 (48).

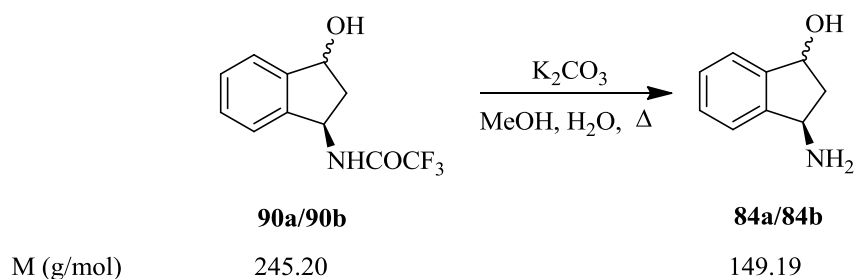
Análisis calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NO}_2$  (245.07): C 53.88, H 4.11, N 5.71; encontrado C 53.97, H 4.05, N 5.87.





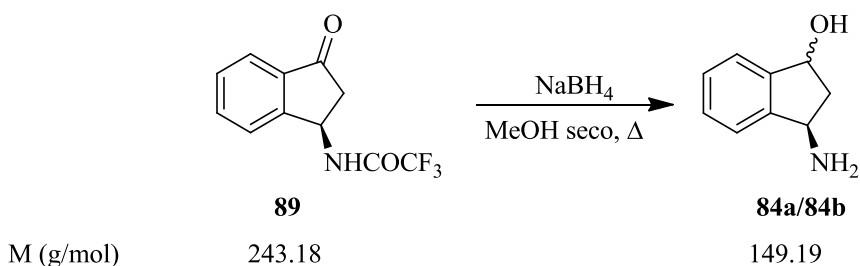
#### 4.6. (±)-*cis* y (±)-*trans*-3-Amino-1-indanol, (84a/84b).

Método A: A partir de la mezcla de compuestos **90a/90b**.



Sobre una disolución de la mezcla de compuestos **90a/90b** (2.30 g; 9.50 mmol) en MeOH (20 mL) se adicionó una disolución de carbonato potásico (2.60 g; 19.1 mmol) en H<sub>2</sub>O (8 mL). Finalizada la adición, la mezcla se reflujo a 90°C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío y se trituro el sólido formado con agua (40 mL). La fase acuosa se extrajo con AcOEt (10 x 40 mL). Las fases orgánicas resultantes se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminó el exceso de disolvente a vacío, obteniéndose un aceite transparente (1.30 g; Rdto. 93%) que fue identificado como la mezcla de compuestos **84a/84b** en una proporción *cis/trans* 60:40.

Método B: A partir del compuesto **89**.



Se disuelve el compuesto **89** (1.50 g; 6.16 mmol) en MeOH seco (15 mL), bajo atmósfera de argón, y a continuación se añade, poco a poco, el borohidruro de sodio (0.48 g; 12.3 mmol). Después de 12 horas la reacción avanza lentamente, por lo que se adiciona otro equivalente de NaBH<sub>4</sub> (0.24 g; 6.15 mmol). Tras 50 horas continúa evolucionando lentamente por lo que se adicionan dos equivalentes más de borohidruro de sodio y se calienta a 60°C durante 46 horas.

A continuación se elimina el exceso de disolvente a vacío, formándose un sólido amarillento que se tritura con agua (30 mL) y se extrae con AcOEt (10 x 15 mL). Las fases orgánicas reunidas, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el exceso de disolvente,

obteniéndose un aceite transparente (0.53 g; Rdto. 56%) que fue identificado como la mezcla de compuestos **84a/84b** en una proporción *cis/trans* 60:40.

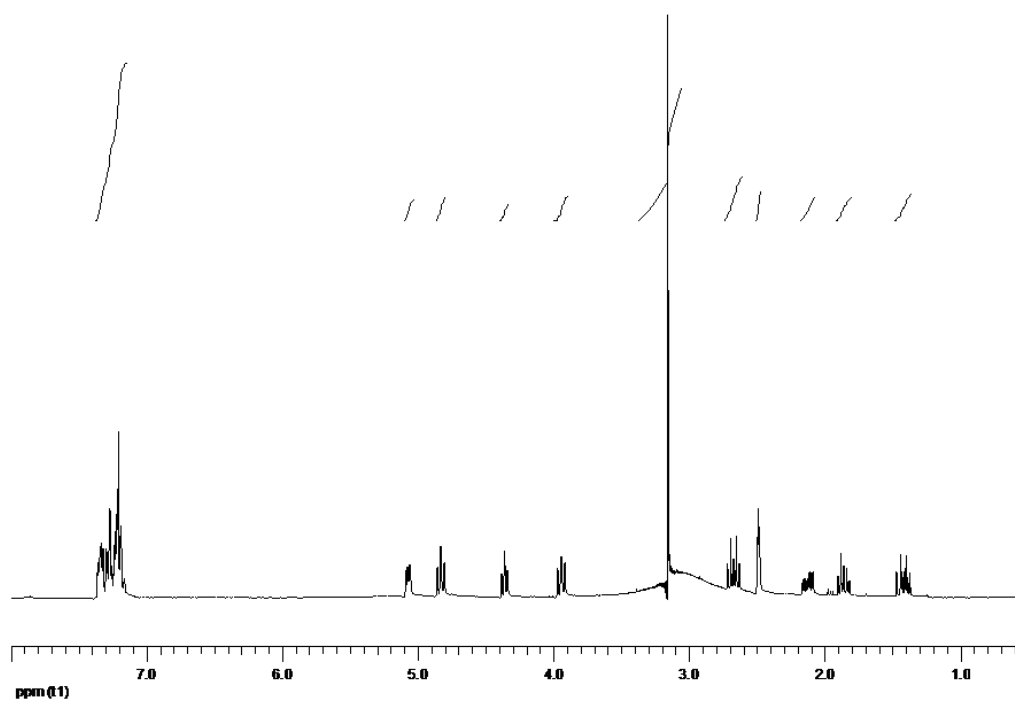
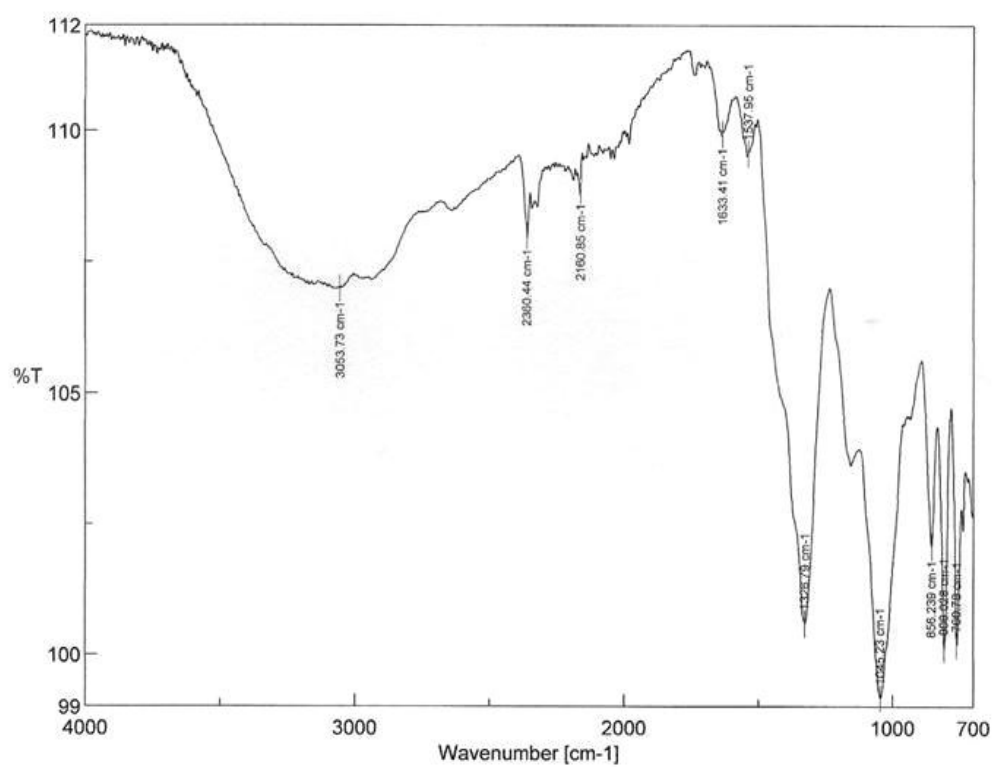
**Compuestos 84a/84b:** Aceite amarillo.

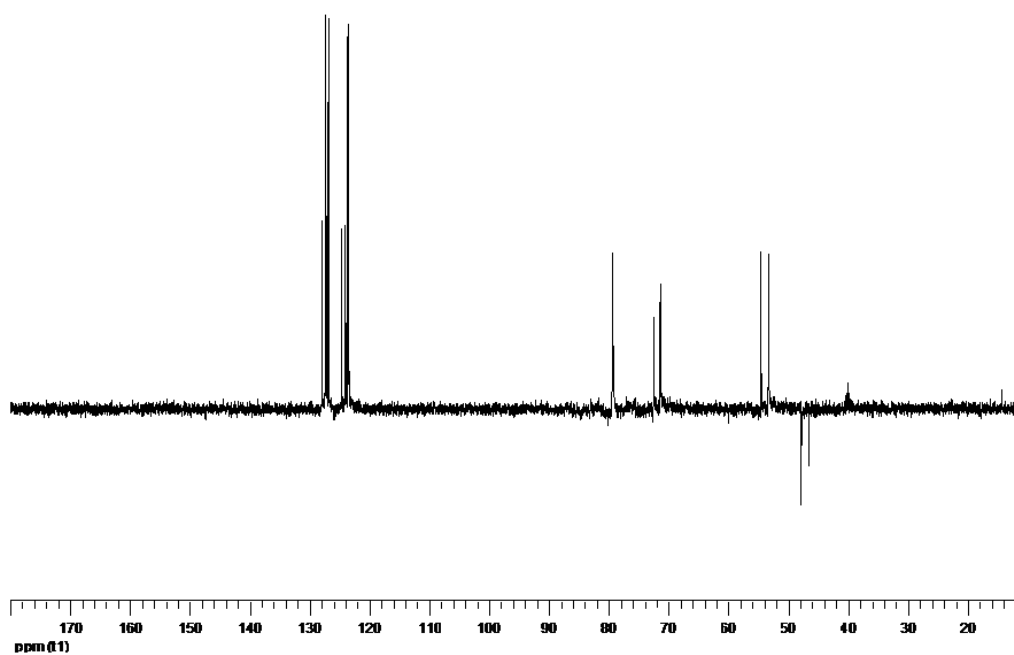
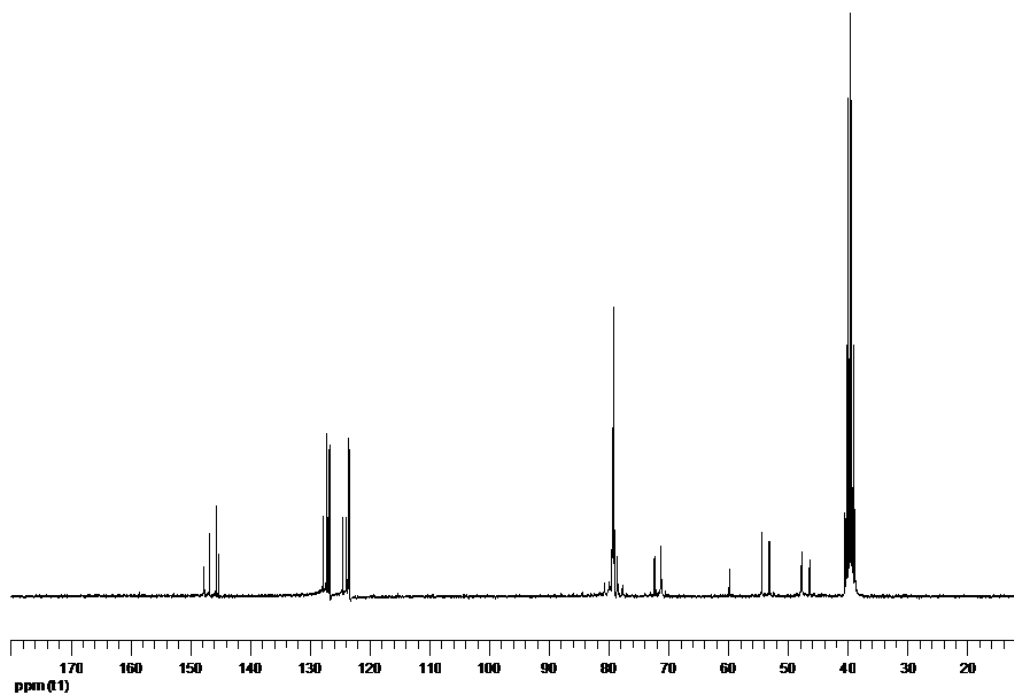
**IR**  $\nu$  = 3277, 1686, 1459, 1054, 761  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta$  = 7.36-7.16 (m, 8H,  $\text{H}_{\text{arom(c+t)}}$ ), 5.07 (dd, 1H,  $J$  = 6.4 Hz, 3.3 Hz, 1- $\text{H}_t$ ), 4.82 (t, 1H,  $J$  = 7.7 Hz, 1- $\text{H}_c$ ), 4.36 (t, 1H,  $J$  = 6.4 Hz, 3- $\text{H}_t$ ), 3.91-3.96 (m, 1H, 3- $\text{H}_c$ ), 3.10 (s. an, 6H, intercambian con  $\text{D}_2\text{O}$ , OH +  $\text{NH}_{2(\text{c+t})}$ ), 2.67 (dt, 1H,  $J$  = 13.7, 7.0 Hz, 2 $\alpha$ - $\text{H}_c$ ), 2.19 (ddd, 1H,  $J$  = 13.2, 7.0, 3.5 Hz, 2 $\alpha$ - $\text{H}_t$ ), 1.90-1.81 (m, 1H, 2 $\beta$ - $\text{H}_t$ ), 1.46-1.36 (m, 1H, 2 $\beta$ - $\text{H}_c$ ).

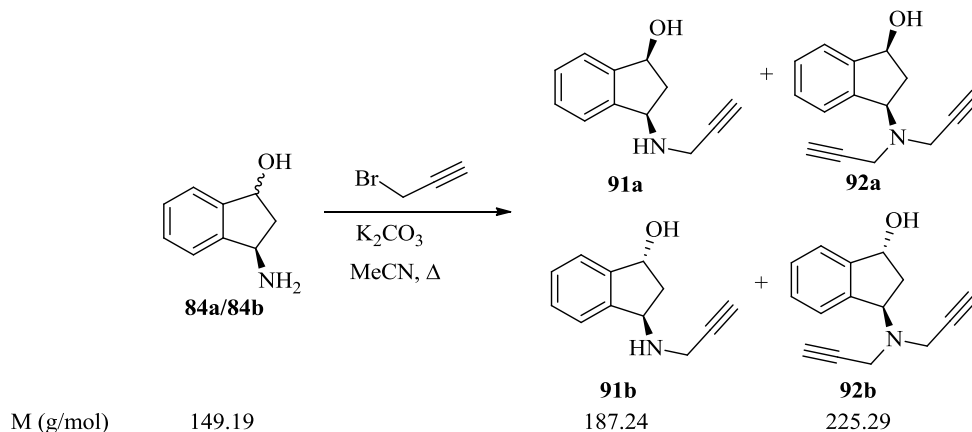
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta$  = 147.65 (C-7 $_{\text{a}_c}$ ), 146.76 (C-7 $_{\text{a}_t}$ ), 145.63 (C-3 $_{\text{a}_c}$ ), 145.21 (C-3 $_{\text{a}_t}$ ), 127.71, 127.13, 126.92, 126.66, 124.44, 123.80, 123.41 y 123.26 ( $\text{CH}_{\text{arom(c+t)}}$ ), 72.22 (C-1 $_c$ ), 71.12 (C-1 $_t$ ), 54.29 (C-3 $_c$ ), 52.99 (C-3 $_t$ ), 47.55 (C-2 $_c$ ), 46.26 (C-2 $_t$ ).

**EM (EI): m/z (%):** 149 (29) [ $\text{M}^+$ ], 148 (23) [ $\text{M}-1$ ] $^+$ , 132 (100) [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ], 117 (18), 104 (98), 77 (19).





**4.7. (±)-*cis* y (±)-*trans*-3-(*N*-Propargilamino)-1-indanol (**91a** y **91b**) y (±)-*cis* y (±)-*trans*-3-(*N,N*-Dipropargilamino)-1-indanol (**92a** y **92b**).**



Sobre una mezcla de **84a/84b** (0.50 g, 3.35 mmol) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.46 g, 3.35 mmol) en MeCN anhidro (15 mL), bajo atmósfera de argón, se adicionó bromuro de propargilo (0.60 mL, 6.70 mmol), gota a gota y a 0°C, y a continuación se reflujo durante 24 horas. A continuación se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío y se disolvió el crudo de reacción en AcOEt (20 mL) y se lavó con NaOH 2N (3 × 25 mL). La fase orgánica resultante se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se eliminó el exceso de disolvente por rotación a vacío, aislándose un aceite marrón que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (25 g), Hexano/AcOEt (4:1), obteniéndose en primer lugar **92a** (0.80 g, Rdto. 18%) como un sólido blanco, luego **92b** (0.60 g, Rdto. 12%) como un sólido amarillo, en tercer lugar **91a** (0.15 g, Rdto. 30%) como un sólido marrón y por último **91b** (0.11 g, Rdto. 22%) como un aceite marrón.

**Compuesto 91a:** Sólido marrón, p.f. 111-112°C.

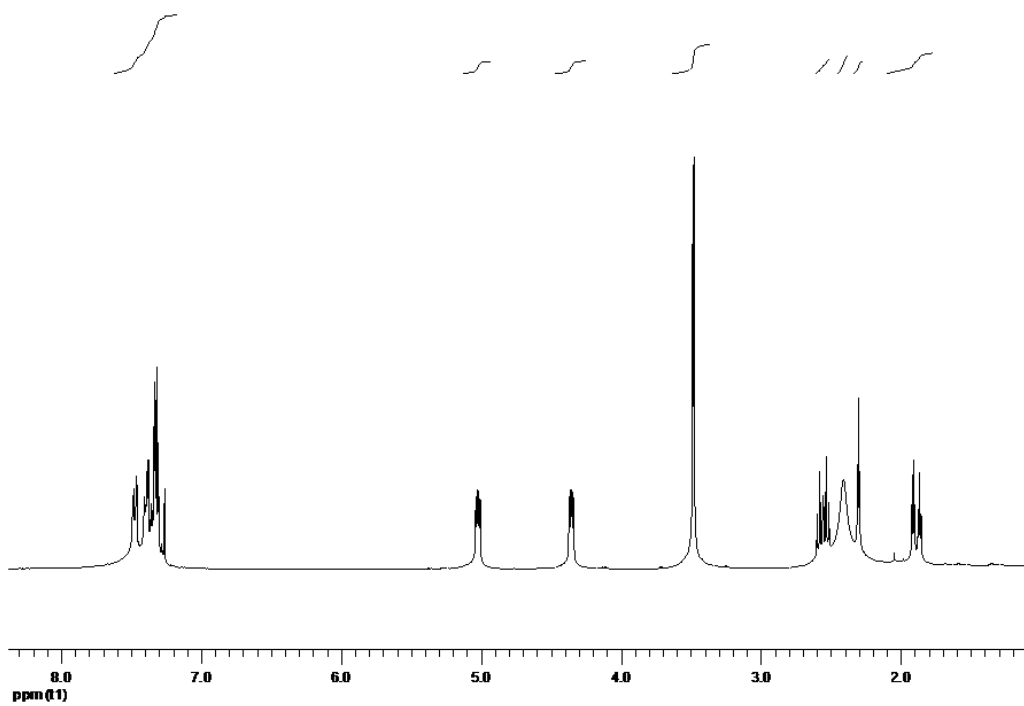
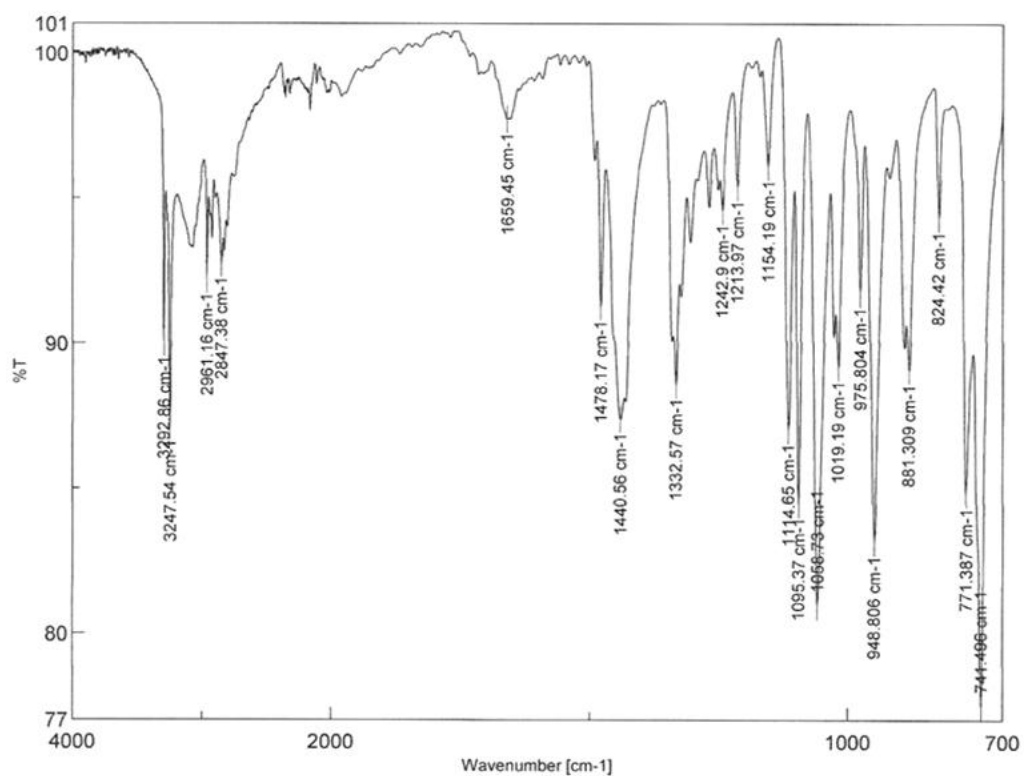
**IR  $\nu$**  = 3248, 1441, 1332, 1058, 768  $\text{cm}^{-1}$ .

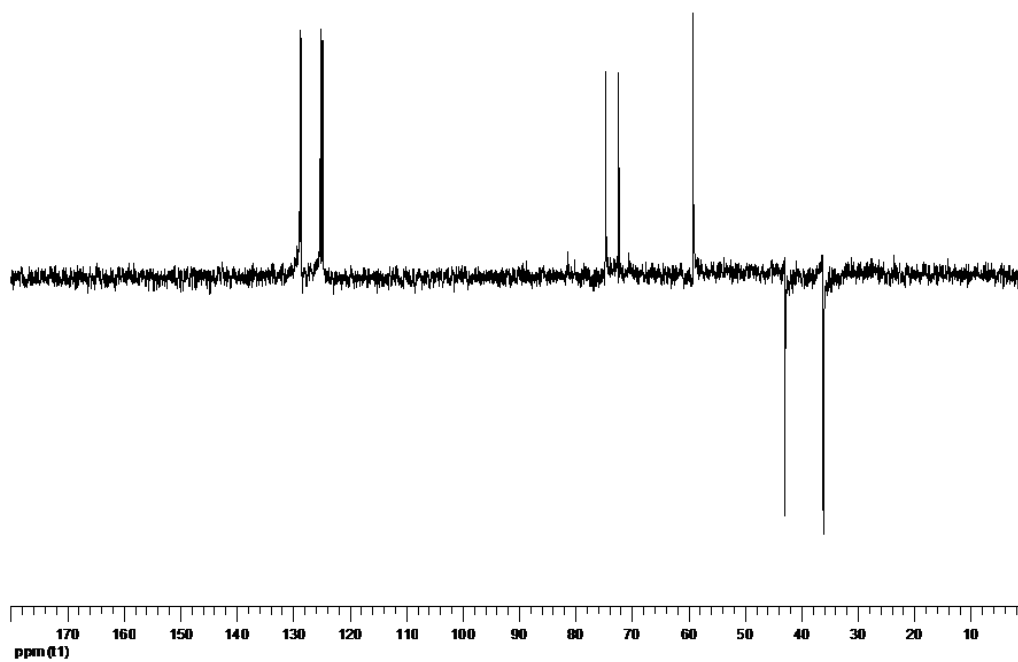
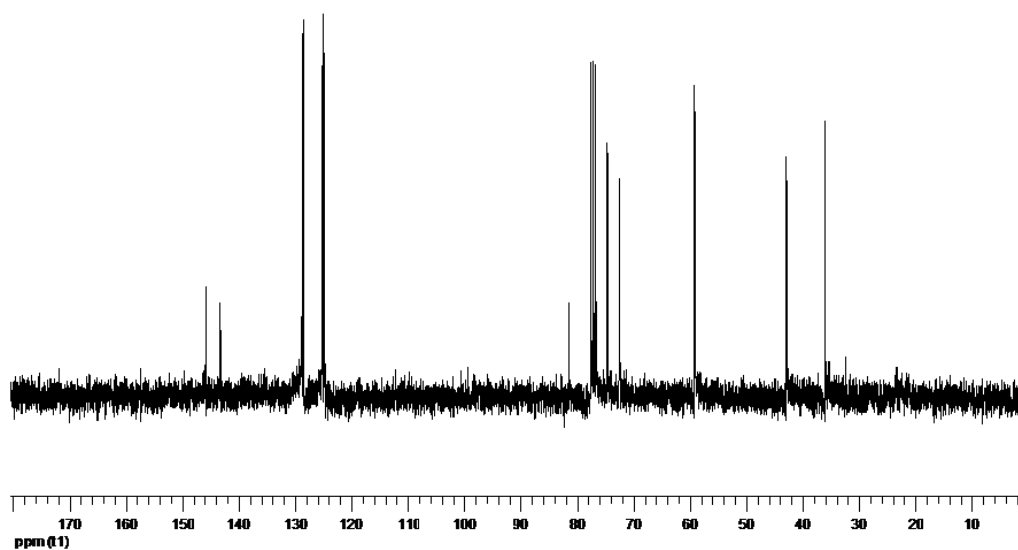
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 7.49-7.27 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.02 (dd, 1H,  $J$  = 6.1, 3.2 Hz, 1-H), 4.35 (dd, 1H,  $J$  = 5.9, 3.2 Hz, 3-H), 3.48 (d, 2H,  $J$  = 2.3 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.55 (dt, 1H,  $J$  = 13.5, 6.5 Hz,  $2\alpha\text{-H}$ ), 2.40 (s. an., 2H, intercambian con  $\text{D}_2\text{O}$ , OH + NH), 2.29 (t, 1H,  $J$  = 2.6 Hz, CH), 1.88 (dt, 1H,  $J$  = 13.5, 2.9 Hz,  $2\beta\text{-H}$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 145.72 (C-7a), 143.24 (C-3a), 128.69, 128.44, 125.07 y 124.70 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 81.32 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 74.54 (C-1), 72.40 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 59.04 (C-3), 42.74 ( $\text{CH}_2$ ), 35.92 (C-2).

**EM (EI):  $m/z$  (%)**: 186 (5)  $[\text{M}-1]^+$ , 168 (26)  $[\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}]$ , 148 (100)  $[\text{M}^+-\text{propargilo}]$ , 130 (71), 116 (72), 77 (80). EMAR (EI)  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}$  calculada. 186.0919, encontrada. 186.0921.







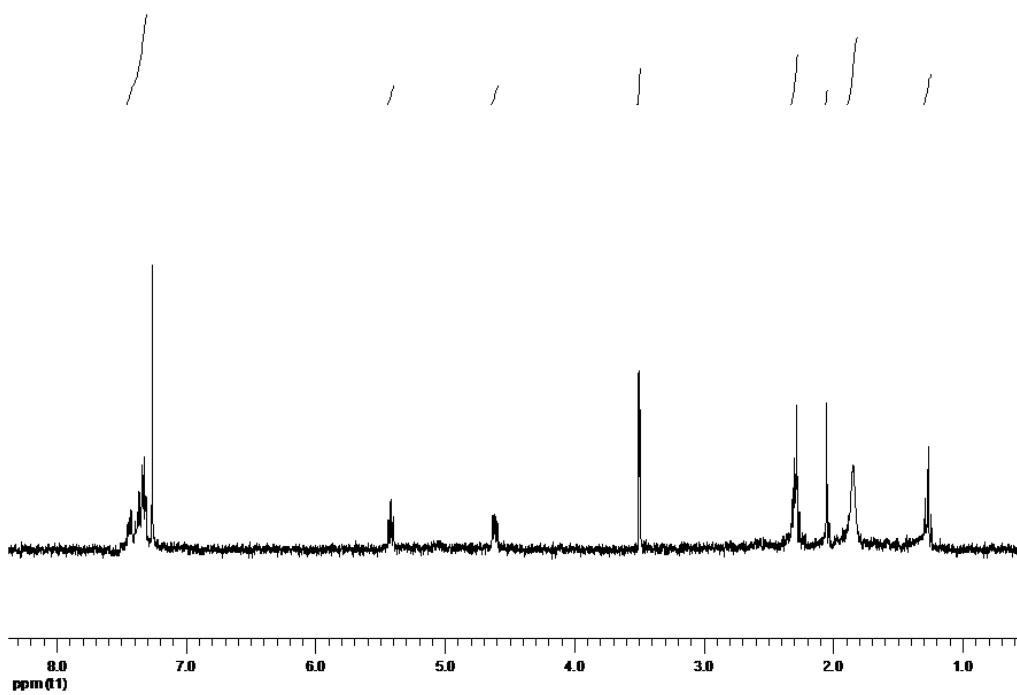
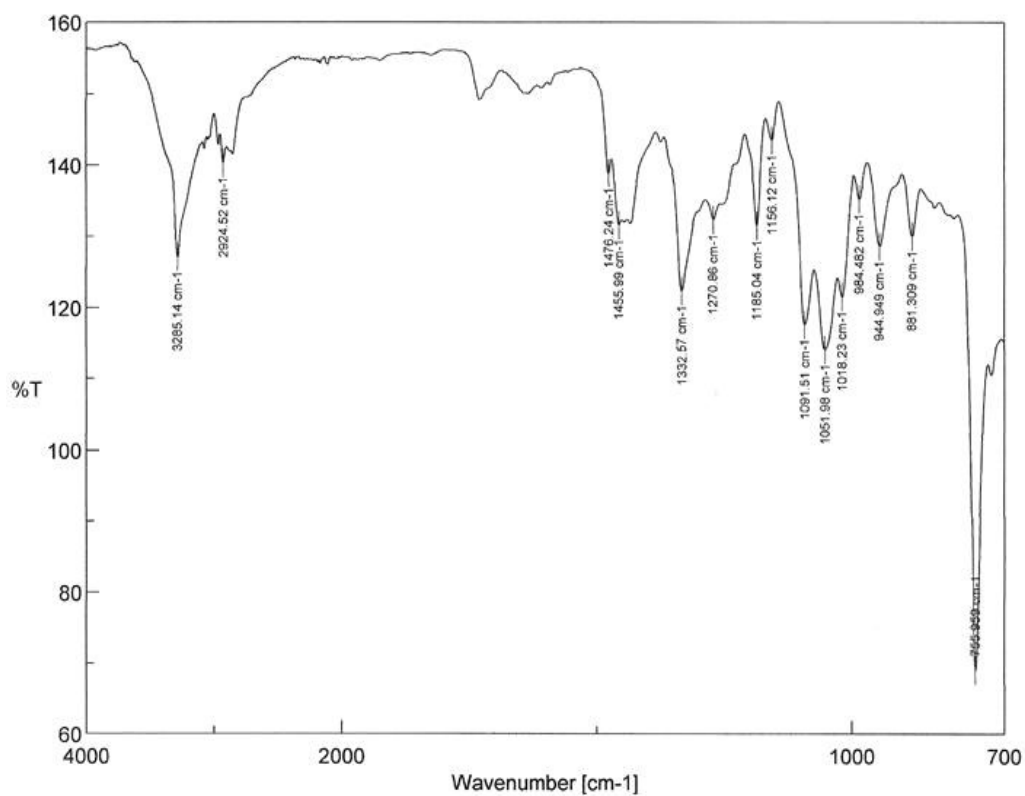
**Compuesto 91b:** Aceite marrón.

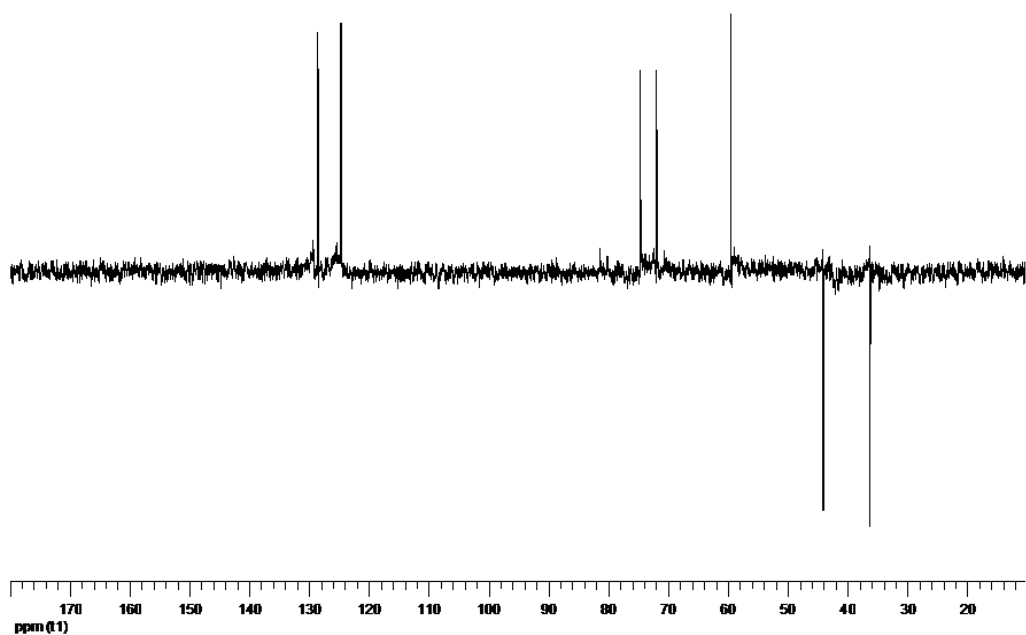
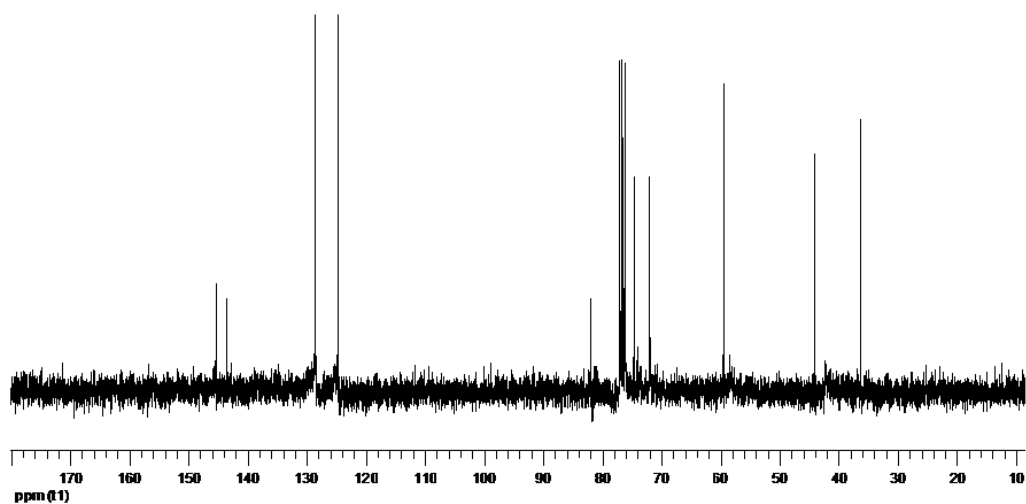
**IR  $\nu$**  = 3285, 1455, 1332, 1051, 755  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 7.44-7.31 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.42 (t, 1H,  $J$  = 5.9 Hz, 1-H), 4.63-4.59 (m, 1H, 3-H), 3.49 (d, 2H,  $J$  = 2.3 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.32-2.26 (m, 1H, 2 $\alpha$ -H), 2.04 (s, 1H, CH), 1.84 (s. an., 2H, intercambian con  $\text{D}_2\text{O}$ , OH + NH), 1.26 (t, 1H,  $J$  = 7.3 Hz, 2 $\beta$ -H).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 145.20 (C-7a), 143.52 (C-3a), 128.52, 128.48, 124.67 y 124.60 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 81.83 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 74.53 (C-1), 71.89 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 59.37 (C-3), 43.94 ( $\text{CH}_2$ ), 36.12 (C-2).

**EM (EI):  $m/z$  (%):** 186 (6)  $[\text{M}-1]^+$ , 168 (23)  $[\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}]$ , 148 (100)  $[\text{M}^+-\text{propargilo}]$ , 130 (63), 116 (49), 103 (70), 77 (67). EMAR(EI):  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}$  calculada. 186.0919, encontrada. 186.0920.





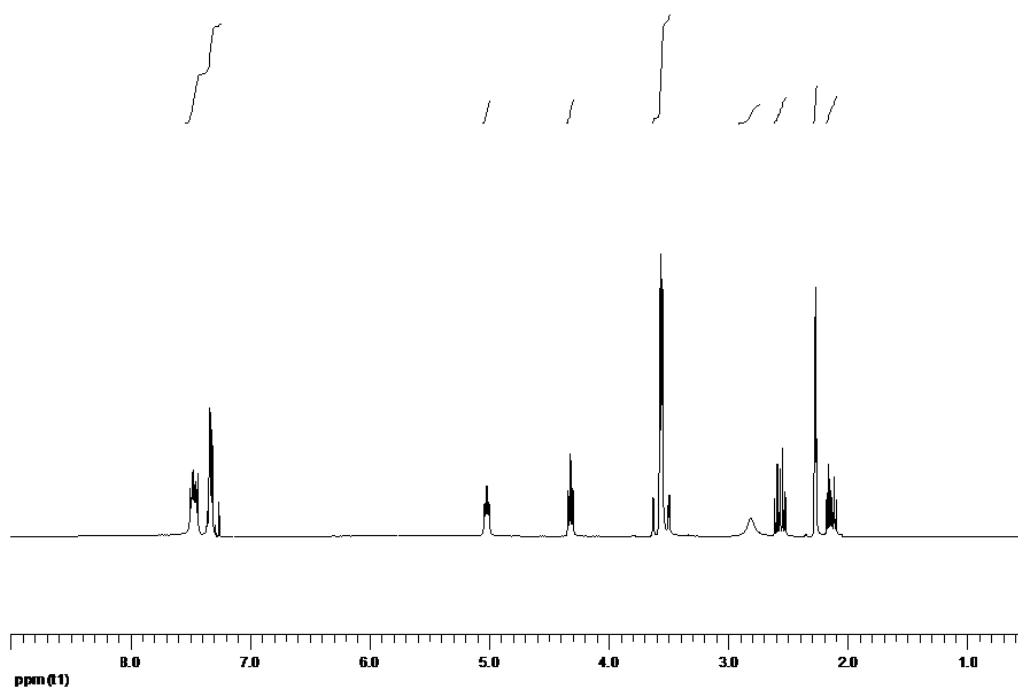
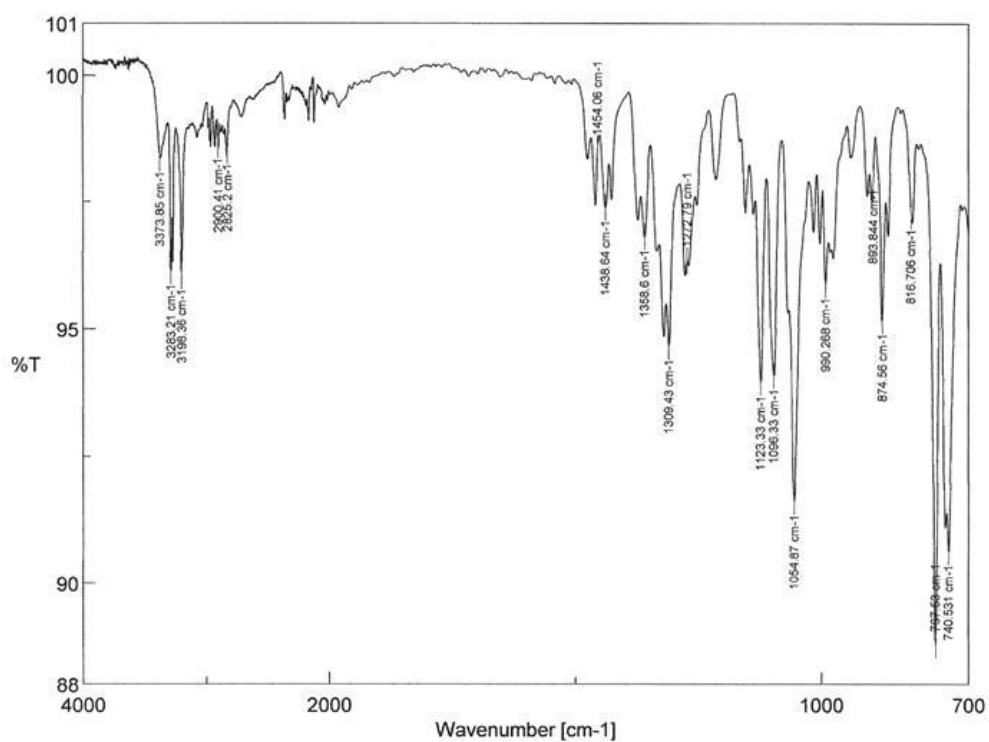
**Compuesto 92a:** Sólido blanco, p.f. 91-92°C.

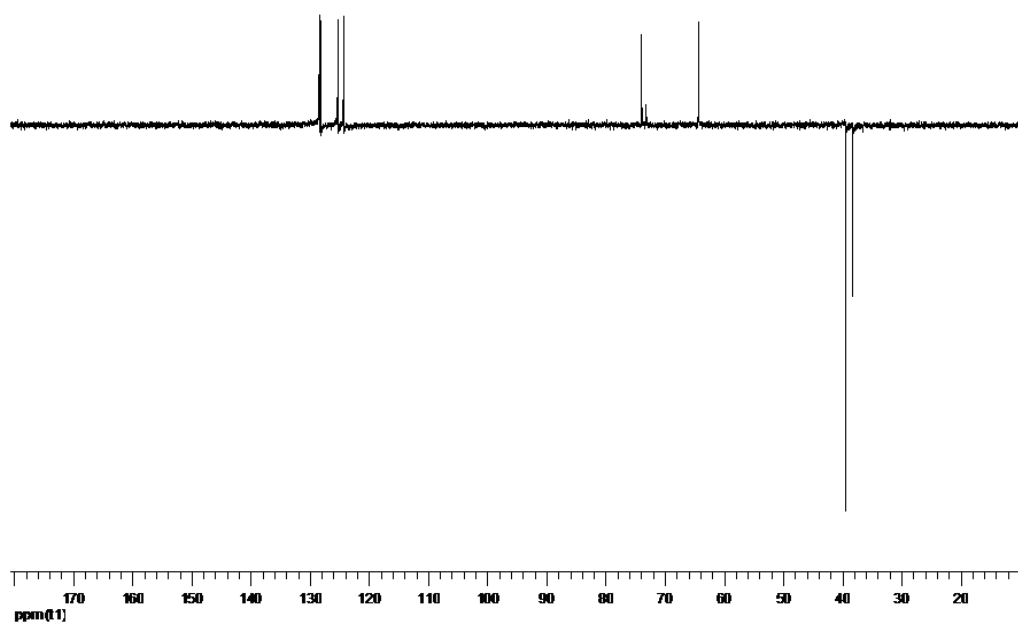
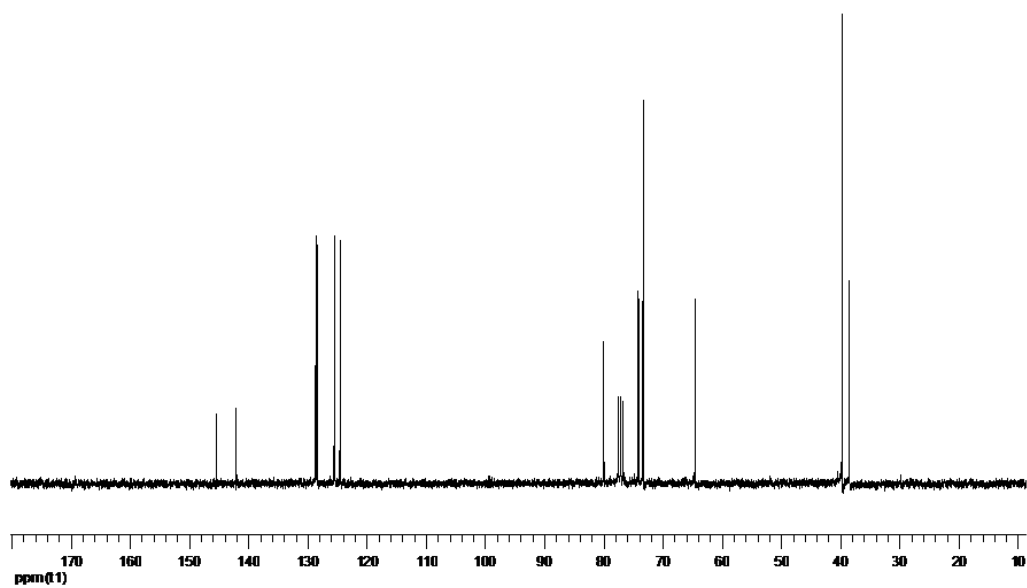
**IR  $\nu$**  = 3283, 3198, 1309, 1123, 1054, 767  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 7.50-7.31 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.02 (t, 1H,  $J$  = 5.4 Hz, 1-H), 4.31 (t, 1H,  $J$  = 6.1 Hz, 3-H), 3.63-3.50 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.9 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.62-3.49 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.9 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.81 (s. an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , OH), 2.56 (dt, 1H,  $J$  = 13.7, 6.1 Hz,  $2\alpha\text{-H}$ ), 2.26 (t, 2H,  $J$  = 2.5 Hz,  $2 \times \text{CH}$ ), 2.13 (dt, 1H,  $J$  = 13.4, 5.0 Hz,  $2\beta\text{-H}$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 145.35 (C-7a), 142.03 (C-3a), 128.58, 128.30, 125.45 y 124.47 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 79.85 ( $2 \times \text{C}\equiv\text{CH}$ ), 74.01 (C-1), 73.22 ( $2 \times \text{C}\equiv\text{CH}$ ), 64.41 (C-3), 39.53 ( $2 \times \text{CH}_2$ ), 38.31 (C-2).

**EM (EI):  $m/z$  (%)**: 225 (3) [ $\text{M}^+$ ], 224 (4) [ $\text{M}-1$ ] $^+$ , 207 (6) [ $\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$ ], 186 (16) [ $\text{M}^+$ -propargilo], 141 (7), 116 (88), 92 (100), 77 (30). EMAR (EI):  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}$  calculada. 225.1154; encontrada 225.1152.







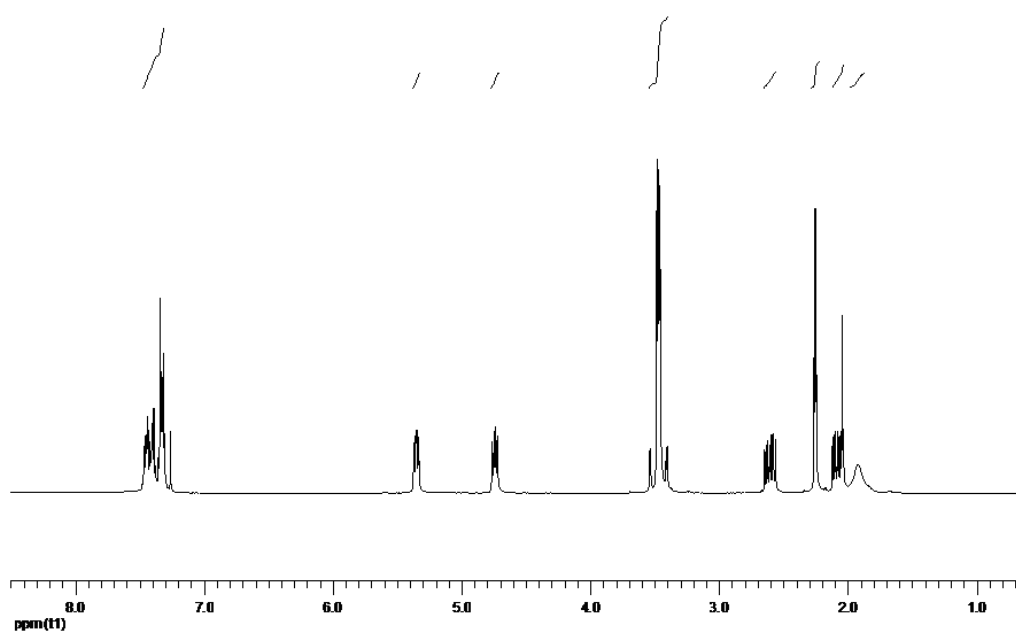
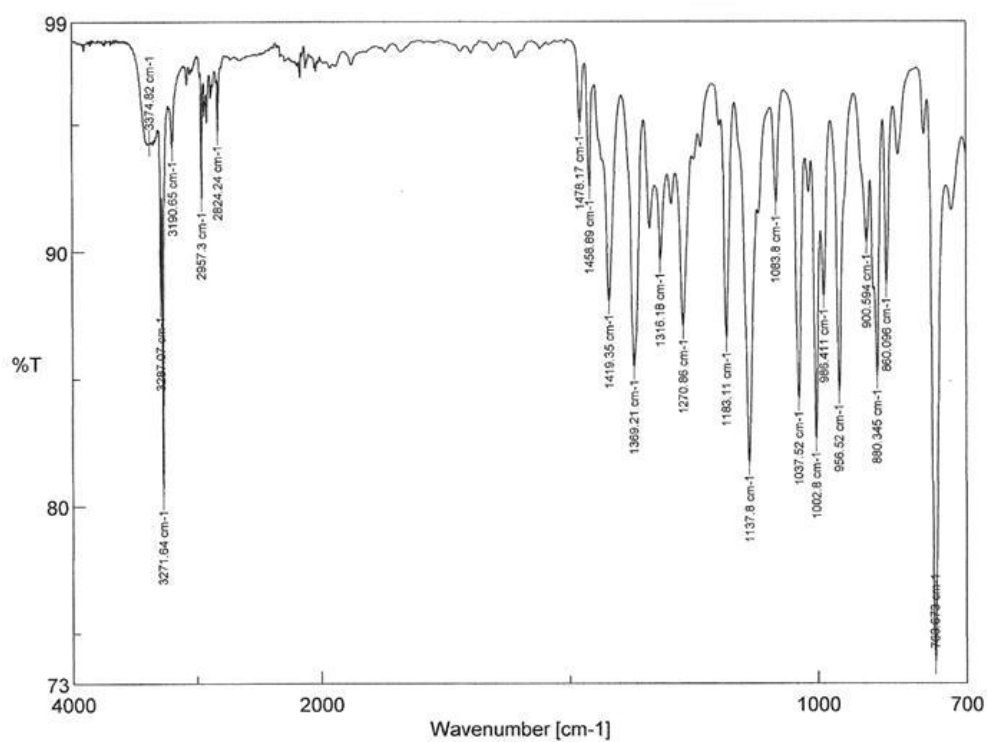
**Compuesto 92b:** Sólido amarillo, p.f. 64-65°C.

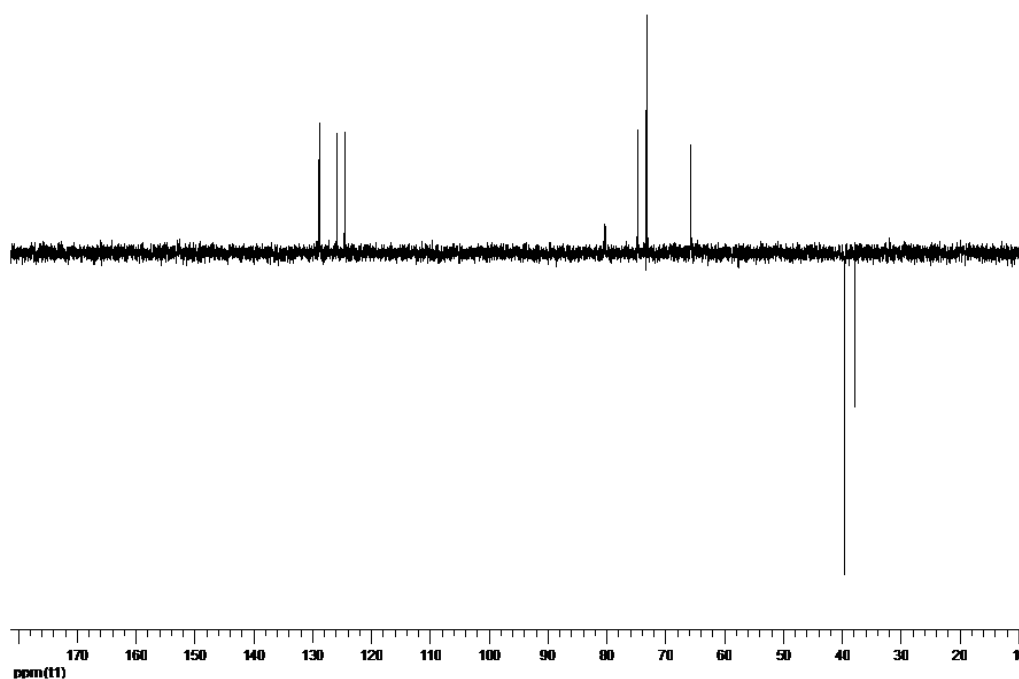
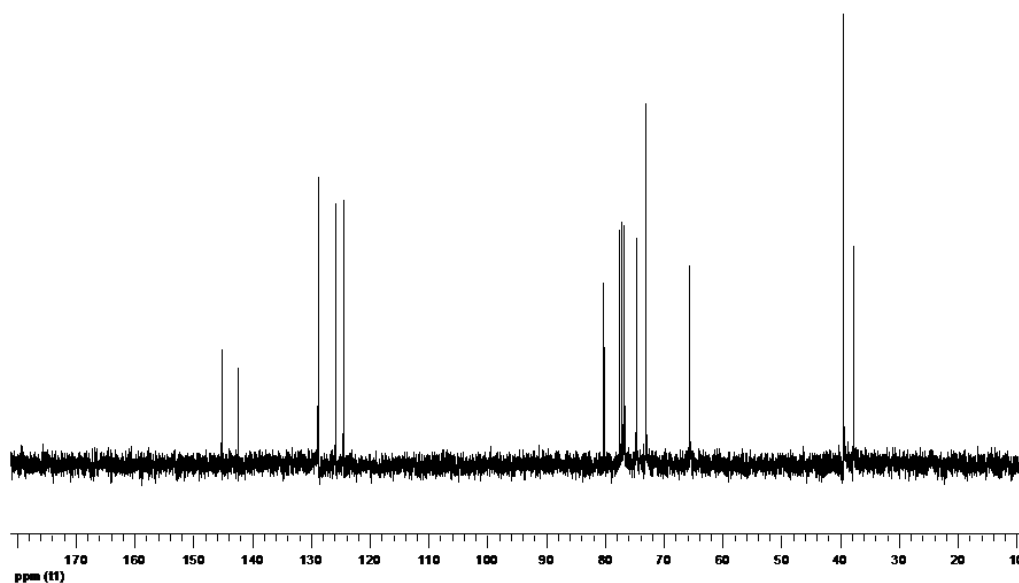
**IR**  $\nu$  = 3271, 2957, 1369, 1137, 1002  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 7.48-7.30 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.35 (dd, 1H,  $J$  = 6.4, 3.8 Hz, 1-H), 4.73 (dd, 1H,  $J$  = 7.0, 5.1 Hz, 3-H), 3.53-3.40 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.9 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.52-3.39 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.9 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.60 (ddd, 1H,  $J$  = 14.0, 6.7, 4.8 Hz,  $2\alpha\text{-H}$ ), 2.24 (t, 2H,  $J$  = 2.5 Hz,  $2 \times \text{CH}$ ), 2.10-2.02 (m, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ), 1.9 (s. an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , OH).

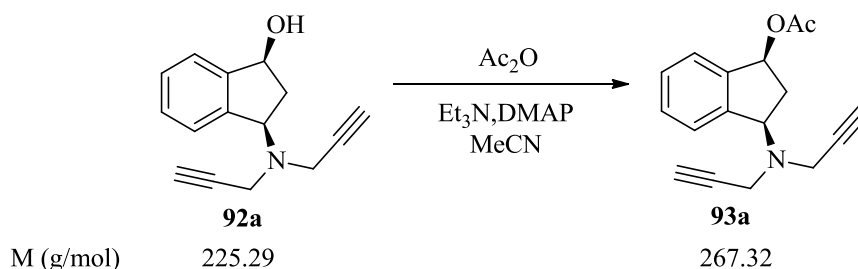
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 145.17 (C-7a), 142.39 (C-3a), 128.73, 128.62, 125.75 y 124.42 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 80.09 ( $2 \times \text{C}\equiv\text{CH}$ ), 74.58 (C-1), 72.94 ( $2 \times \text{C}\equiv\text{CH}$ ), 65.49 (C-3), 39.30 ( $2 \times \text{CH}_2$ ), 37.62 (C-2).

**EM (EI): m/z (%)**: 225 (6) [ $\text{M}^+$ ], 224 (4) [ $\text{M}-1$ ] $^+$ , 207 (6) [ $\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$ ], 186 (25) [ $\text{M}^+$ -propargilo], 141 (9), 116 (94), 92 (100), 77 (51). EMAR (EI):  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}$  calculada. 225.1154; encontrada. 225.1148.





#### 4.8. Acetato de (±)-cis-3-(N,N-dipropargilamino)-1-indanilo (**93a**).



Sobre una disolución de **92a** (0.08 g, 0.36 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP en MeCN anhidro (5 mL), bajo atmósfera de argón, se adicionó, gota a gota, Et<sub>3</sub>N (100 µL, 0.72 mmol) y anhídrido acético (69 µL, 0.72 mmol), a 0°C. A continuación se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, finalizadas las cuales se evaporó el exceso de disolvente y el residuo obtenido se disolvió en AcOEt (10 mL) y se extrajo con H<sub>2</sub>O (3 × 15 mL) y posteriormente con una solución saturada de NaCl (3 × 15 mL). La fase orgánica resultante se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminó el exceso de disolvente a vacío obteniéndose **93a** (0.092 g, Rdto. 96%) como un sólido blanco.

**Compuesto 93a:** Sólido blanco, p.f. 72-73°C.

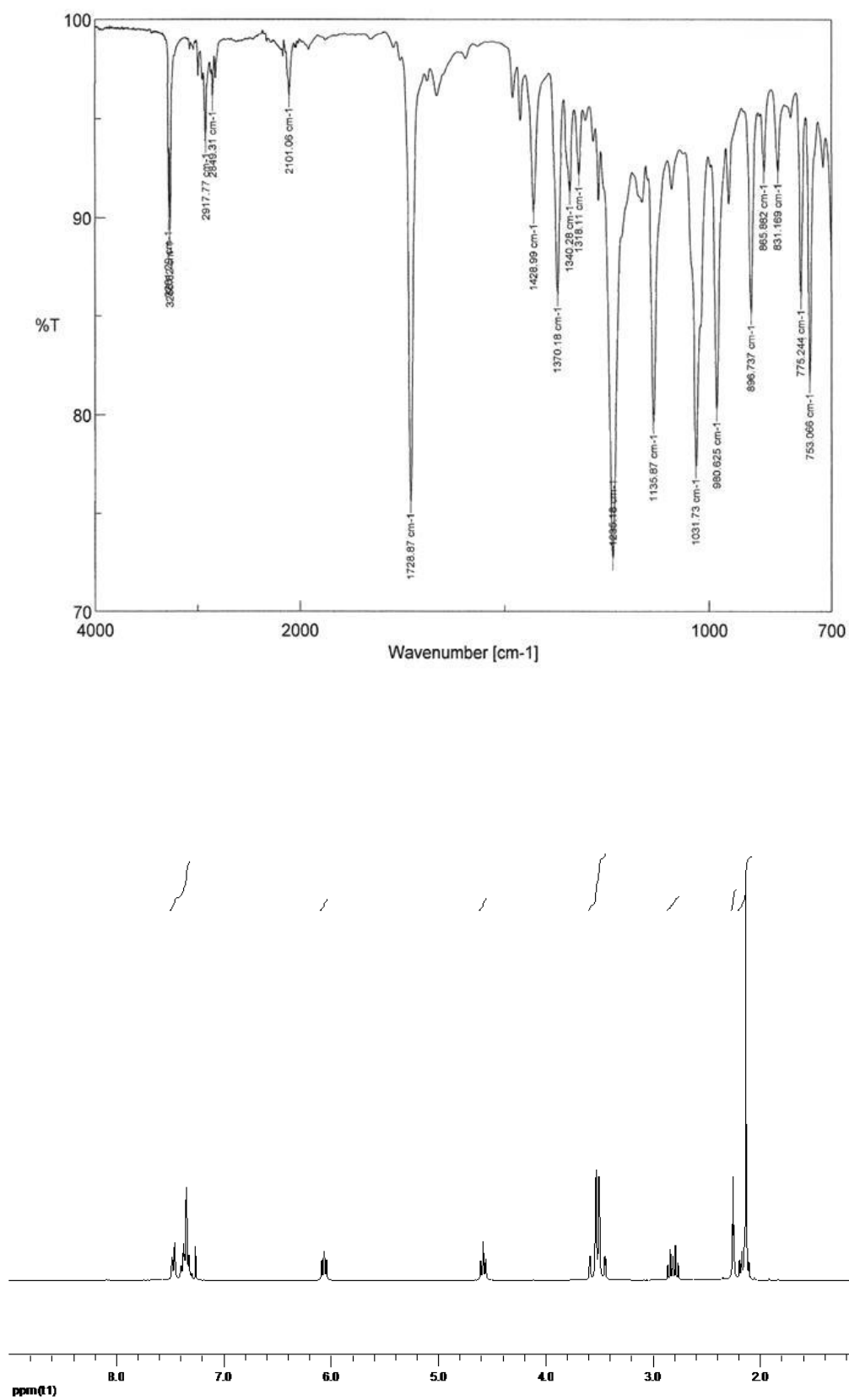
**IR ν** = 3266, 2917, 1728, 1235, 1031 cm<sup>-1</sup>.

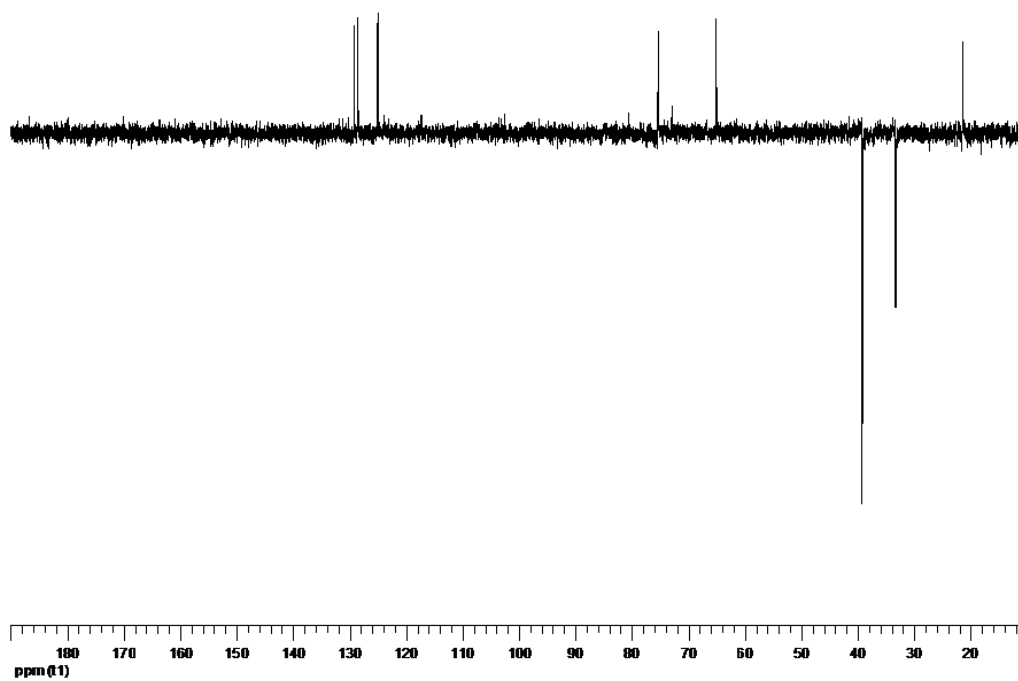
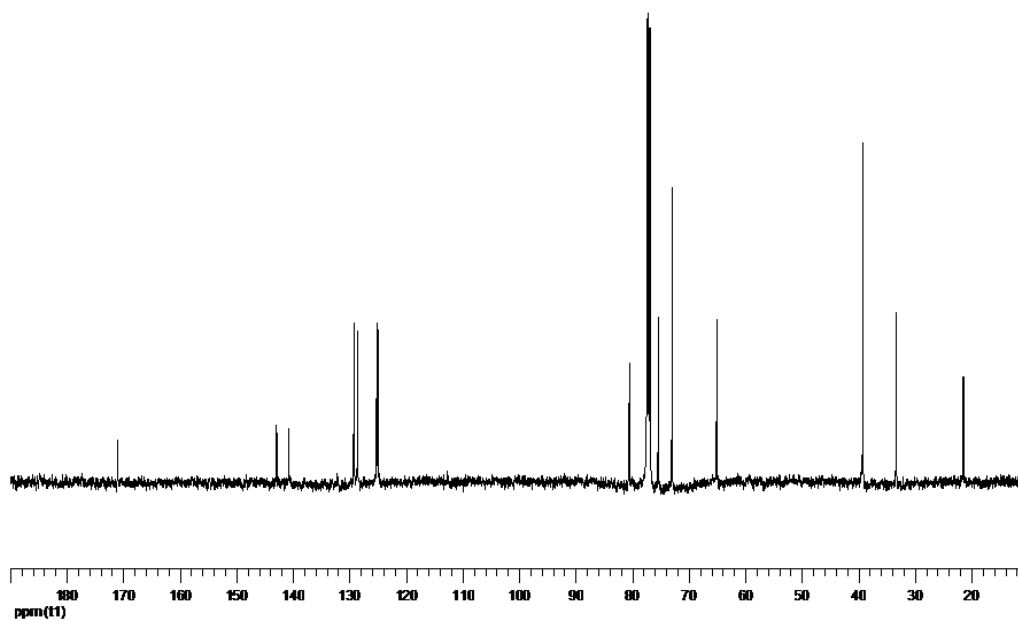
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 7.48-7.32 (m, 4H, H<sub>arom</sub>), 6.06 (t, 1H, *J* = 13.5 Hz, 1-H), 4.58 (t, 1H, *J* = 14.5 Hz, 3-H), 3.58-3.44 (sistema AB, 2H, *J* = 16.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.57-3.43 (sistema AB, 2H, *J* = 16.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.81 (dt, 1H, *J* = 15.2, 7.4 Hz, 2α-H), 2.24 (t, 2H, *J* = 2.5 Hz, 2 × CH), 2.19-2.13 (m, 4H, 2β-H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 171.01 (C=OCH<sub>3</sub>), 142.84 (C-7a), 140.65 (C-3a), 129.16, 128.50, 125.10 y 124.88 (CH<sub>arom</sub>), 80.39 (2 × C≡CH), 75.26 (C-1), 72.81 (2 × C≡CH), 64.91 (C-3), 39.03 (2 × CH<sub>2</sub>), 33.12 (C-2), 21.24 (CH<sub>3</sub>).

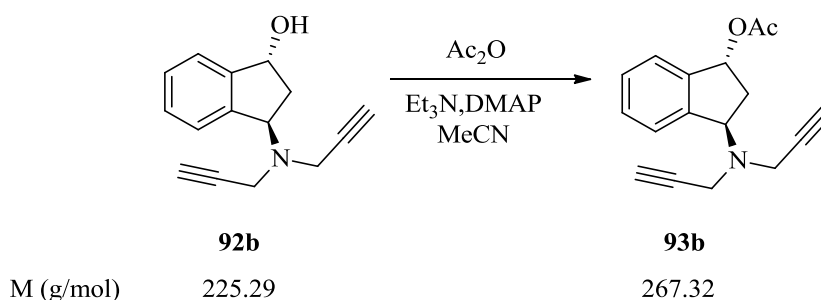
**EM (FAB): m/z (%)**: 269 (5) [M+2]<sup>+</sup>, 268 (26) [M+1]<sup>+</sup>, 225 (2) [M<sup>+</sup>-acetilo], 208 (5), 171 (5), 154 (91), 137 (100).

Análisis calculado para C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub> (267.32): C 76.38, H 6.41, N 5.24; encontrado C 76.65, H 6.12, N 5.02.





#### 4.9. Acetato de (±)-*trans*-3-(*N,N*-dipropargilamino)-1-indanilo (**93b**).



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **93a** (véase apartado 4.8) hemos obtenido **93b** a partir de **92b** por reacción con anhídrido acético, Et<sub>3</sub>N, DMAP en MeCN, obteniéndose **93b** (0.080 g, Rdto. 67%) como un sólido blanco.

**Compuesto 93b:** Sólido blanco, p.f. 70-71°C.

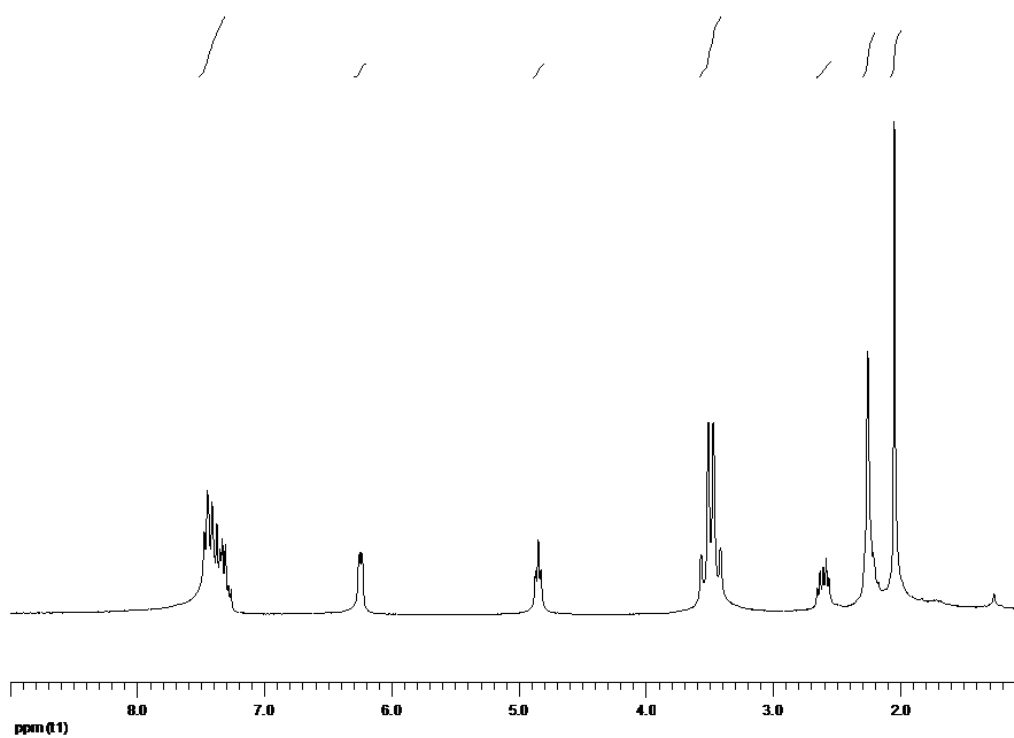
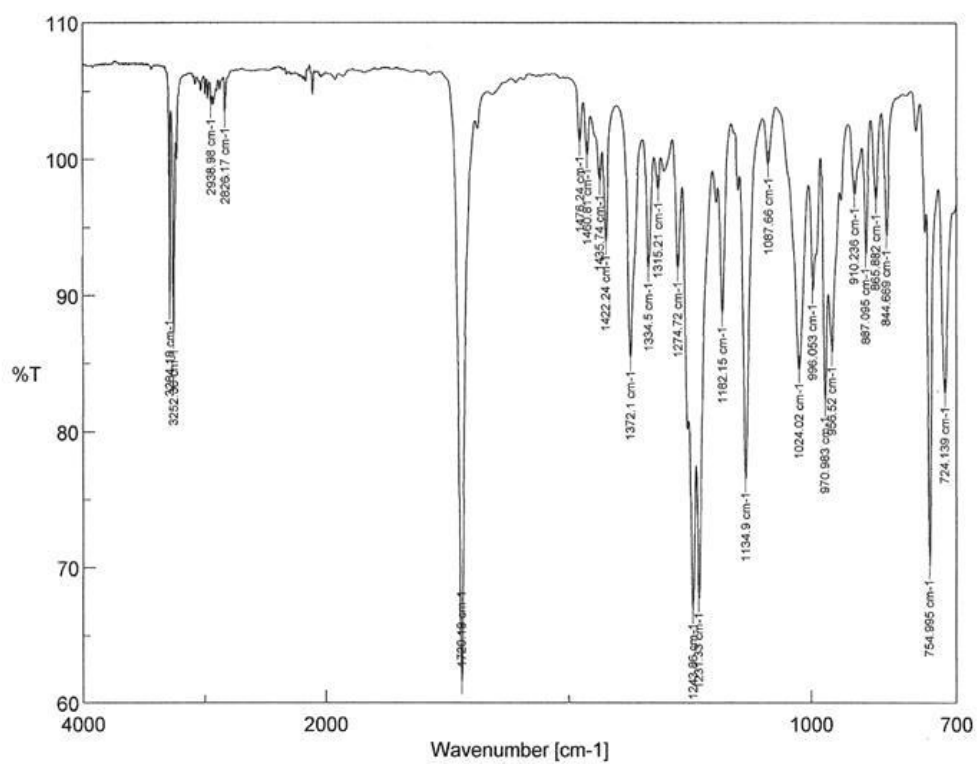
**IR**  $\nu$  = 3284, 3252, 1720, 1243, 1134 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.47-7.28 (m, 4H, H<sub>arom</sub>), 6.24 (d, 1H,  $J$  = 4.4 Hz, 1-H), 4.84 (t, 1H,  $J$  = 6.4 Hz, 3-H), 3.57-3.41 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.56-3.40 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.64-2.55 (m, 1H, 2 $\alpha$ -H), 2.25-2.21 (m, 3H, 2 $\beta$ -H, 2  $\times$  CH), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

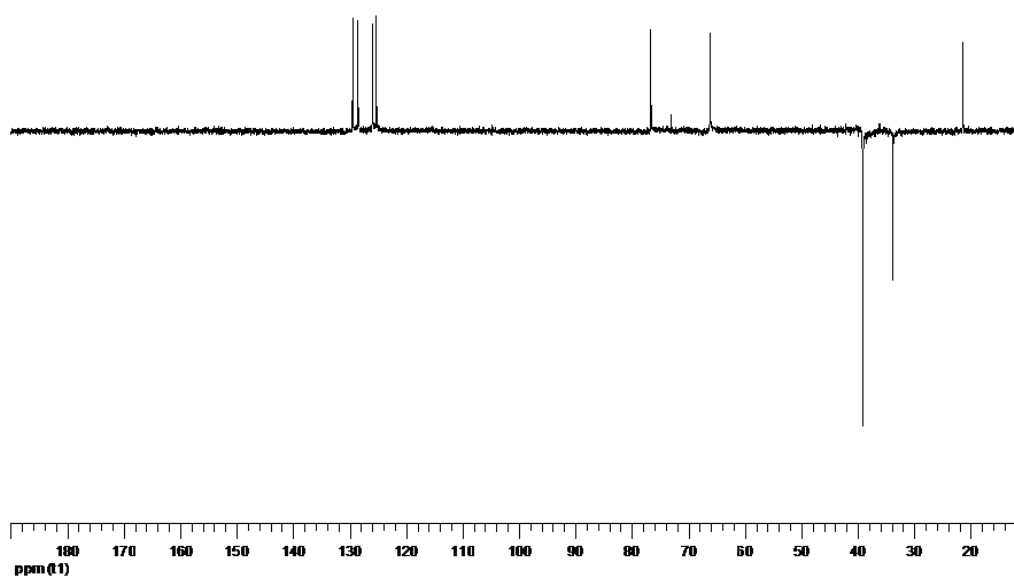
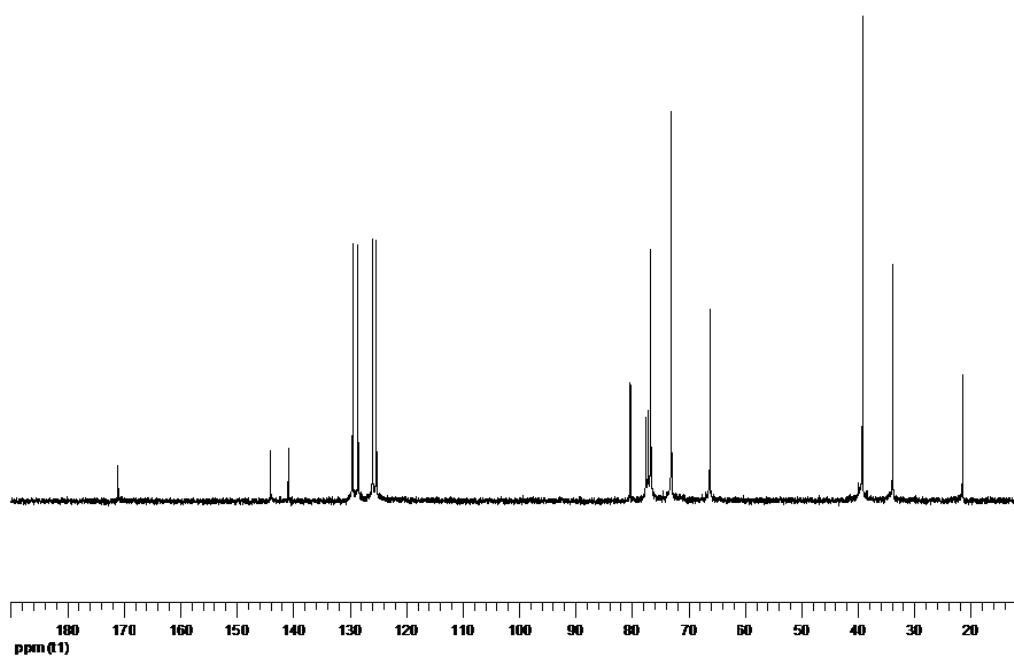
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 171.01 (C=OCH<sub>3</sub>), 143.96 (C-7a), 140.84 (C-3a), 129.42, 128.46, 125.88 y 125.22 (CH<sub>arom</sub>), 80.18 (2  $\times$  C $\equiv$ CH), 76.55 (C-1), 72.91 (2  $\times$  C $\equiv$ CH), 66.06 (C-3), 38.98 (2  $\times$  CH<sub>2</sub>), 33.63 (C-2), 21.25 (CH<sub>3</sub>).

**EM (FAB): m/z (%):** 269 (2) [M+2]<sup>+</sup>, 268 (9) [M+1]<sup>+</sup>, 230 (70), 186 (5), 154 (100), 137 (97).

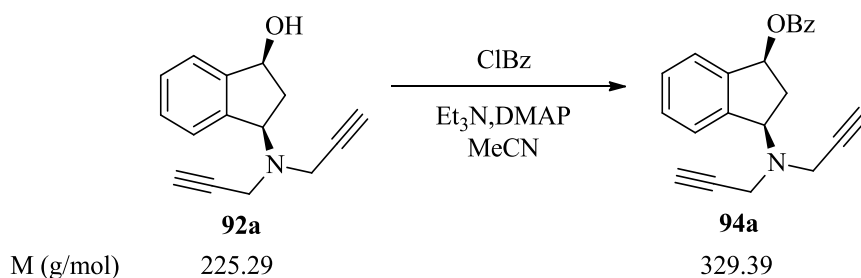
Análisis calculado para C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub> (267.32): C 76.38, H 6.41, N 5.24; encontrado C 76.01, H 6.83, N 5.11.







#### 4.10. Benzoato de (±)-*cis*-3-(*N,N*-dipropargilamino)-1-indanilo (**94a**).



Sobre una disolución de **92a** (0.08 g, 0.36 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP en MeCN anhidro (5 mL), bajo atmósfera de argón, se añadió Et<sub>3</sub>N (100 µL, 0.72 mmol) y cloruro de benzoilo (82 µL, 0.72 mmol), a 0°C y gota a gota. Se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, finalizadas las cuales se eliminó el exceso de disolvente y se disolvió el residuo obtenido en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) y se lavó, sucesivamente, con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 × 10 mL) y con una solución de NaCl saturada (3 × 10 mL). La fase orgánica resultante se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se rotó a vacío, obteniéndose un aceite amarillo que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (5 g), Hexano/AcOEt/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30:1:1), obteniéndose **94a** (0.065 g, Rdto. 65%) como un aceite transparente.

**Compuesto 94a:** Aceite transparente.

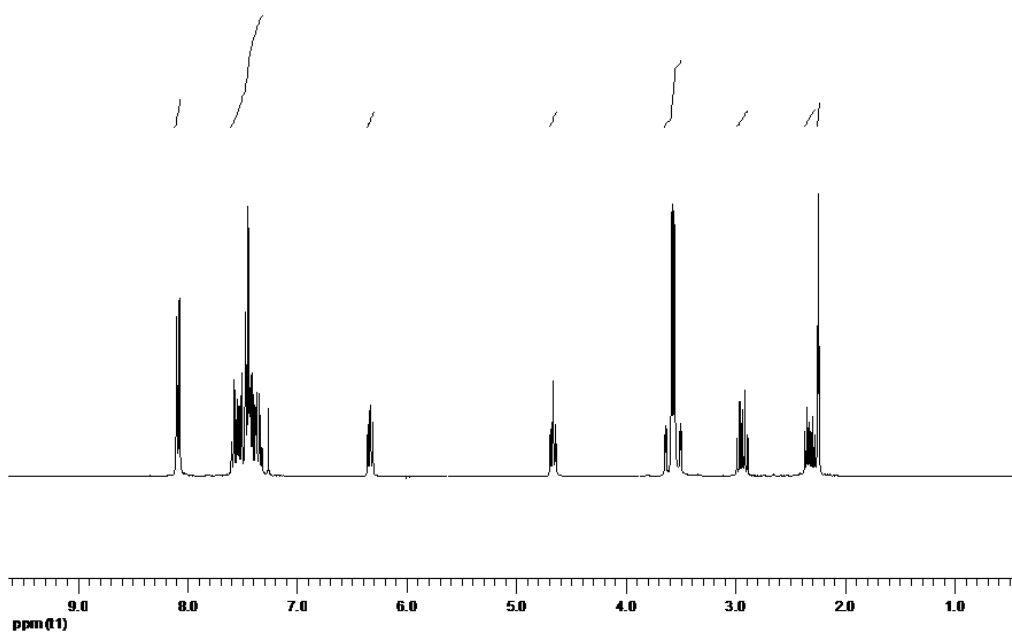
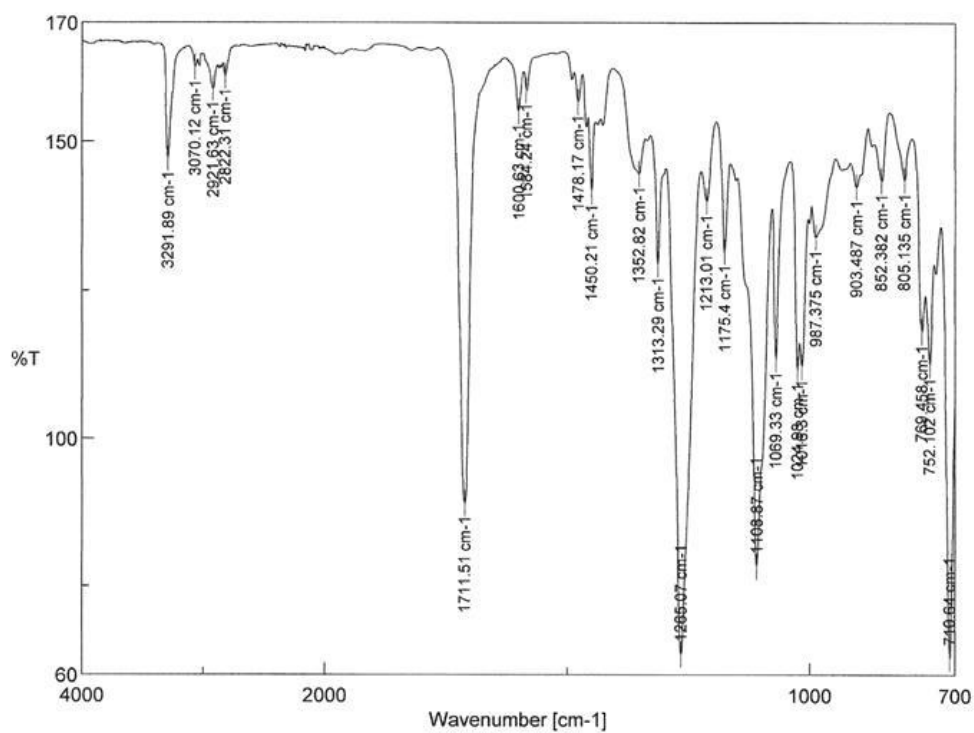
**IR**  $\nu$  = 3291, 1711, 1265, 1108, 1069, 769 cm<sup>-1</sup>.

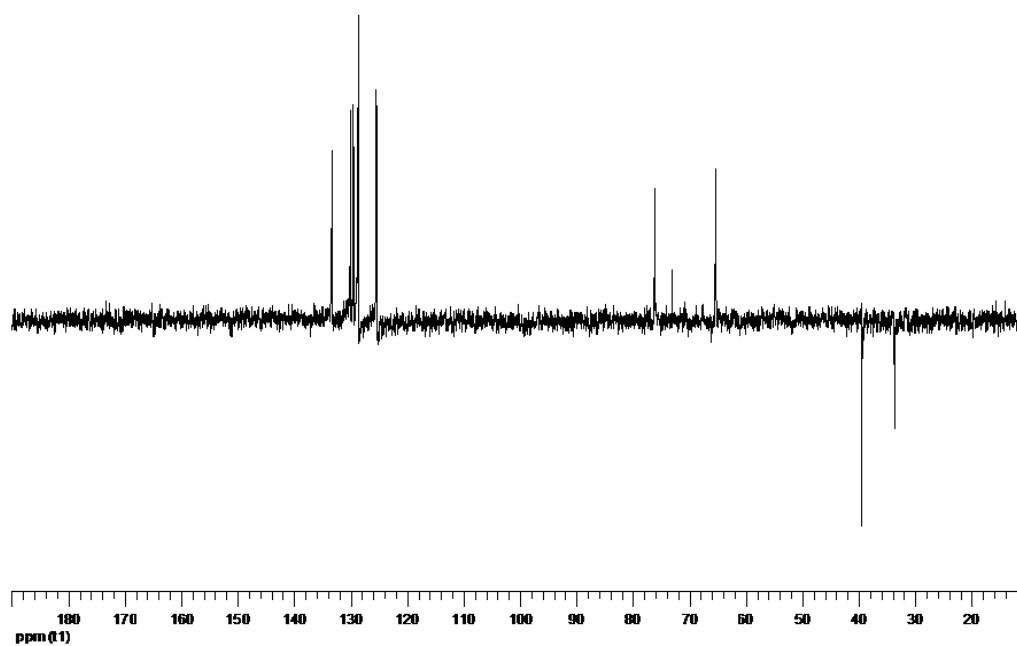
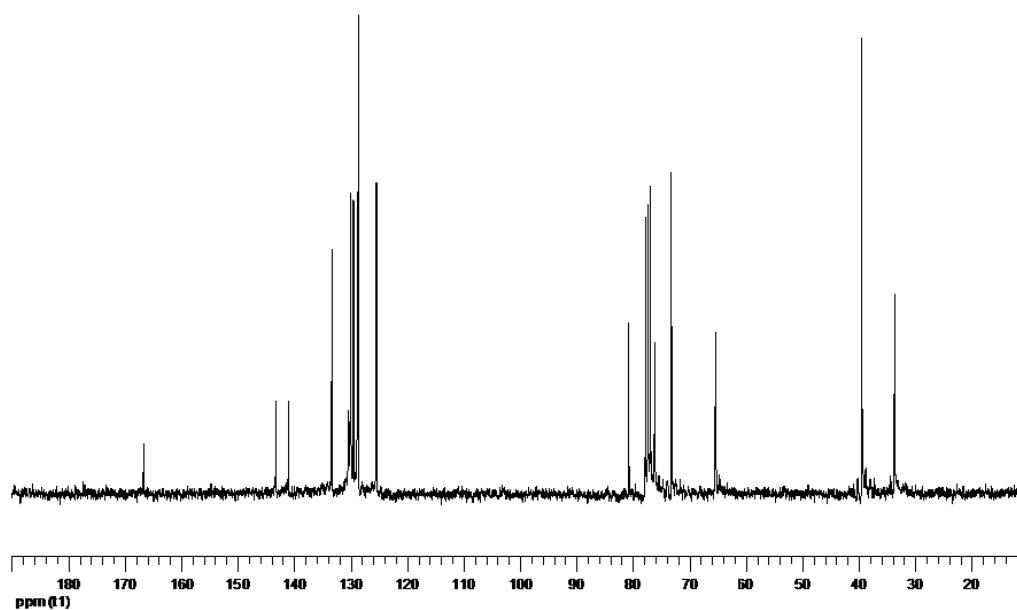
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 8.10-8.07 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.60-7.32 (m, 7H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 4 × H<sub>arom</sub>), 6.33 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, 1-H), 4.66 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, 3-H), 3.64-3.50 (sistema AB, 2H, *J* = 17.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.63-3.49 (sistema AB, 2H, *J* = 17.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.93 (dt, 1H, *J* = 14.9, 7.6 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.13 (dt, 1H, *J* = 14.1, 6.7 Hz, 2 $\beta$ -H), 2.24 (t, 2H, *J* = 2.3 Hz, 2 × CH).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 166.69 (CO), 143.23 (C-7a), 140.97 (C-3a), 133.29 (C'-4), 130.49 (C'-1), 129.96, 129.46, 128.77, 128.62, 125.39 y 125.32 (4 × CH<sub>arom</sub>, 4 × C'-H), 80.65 (2 × C $\equiv$ CH), 76.05 (C-1), 73.08 (2 × C $\equiv$ CH), 65.28 (C-3), 39.31 (2 × CH<sub>2</sub>), 33.52 (C-2).

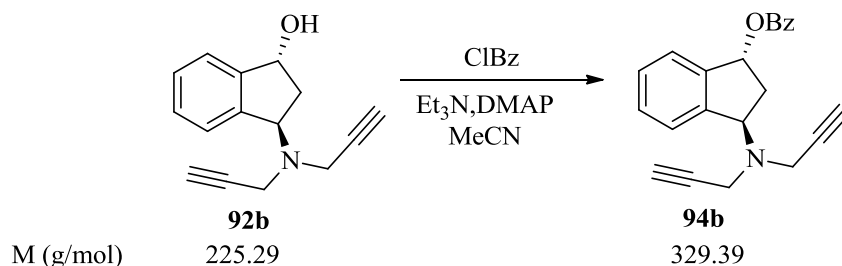
**EM (FAB): m/z (%):** 331 (12) [M+2]<sup>+</sup>, 330 (37) [M+1]<sup>+</sup>, 231 (59), 186 (5), 154 (92), 137 (100), 105 (34).

Análisis calculado para C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> (329.39): C 80.22, H 5.81, N 4.25; encontrado C 80.56, H 5.45, N 4.39.





#### 4.11. Benzoato de (±)-*trans*-3-(*N,N*-dipropargilamino)-1-indanilo (**94b**).



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **94a** (véase apartado 4.10) hemos obtenido **94b** a partir de **92b** por reacción con cloruro de benzoilo, Et<sub>3</sub>N y DMAP en MeCN, aislándose un aceite amarillo que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (8 g), Hexano/AcOEt (5:1), obteniéndose **94b** (0.09 g, Rdto. 65%) como un sólido blanco.

**Compuesto 94b:** Sólido blanco, p.f. 74-75°C.

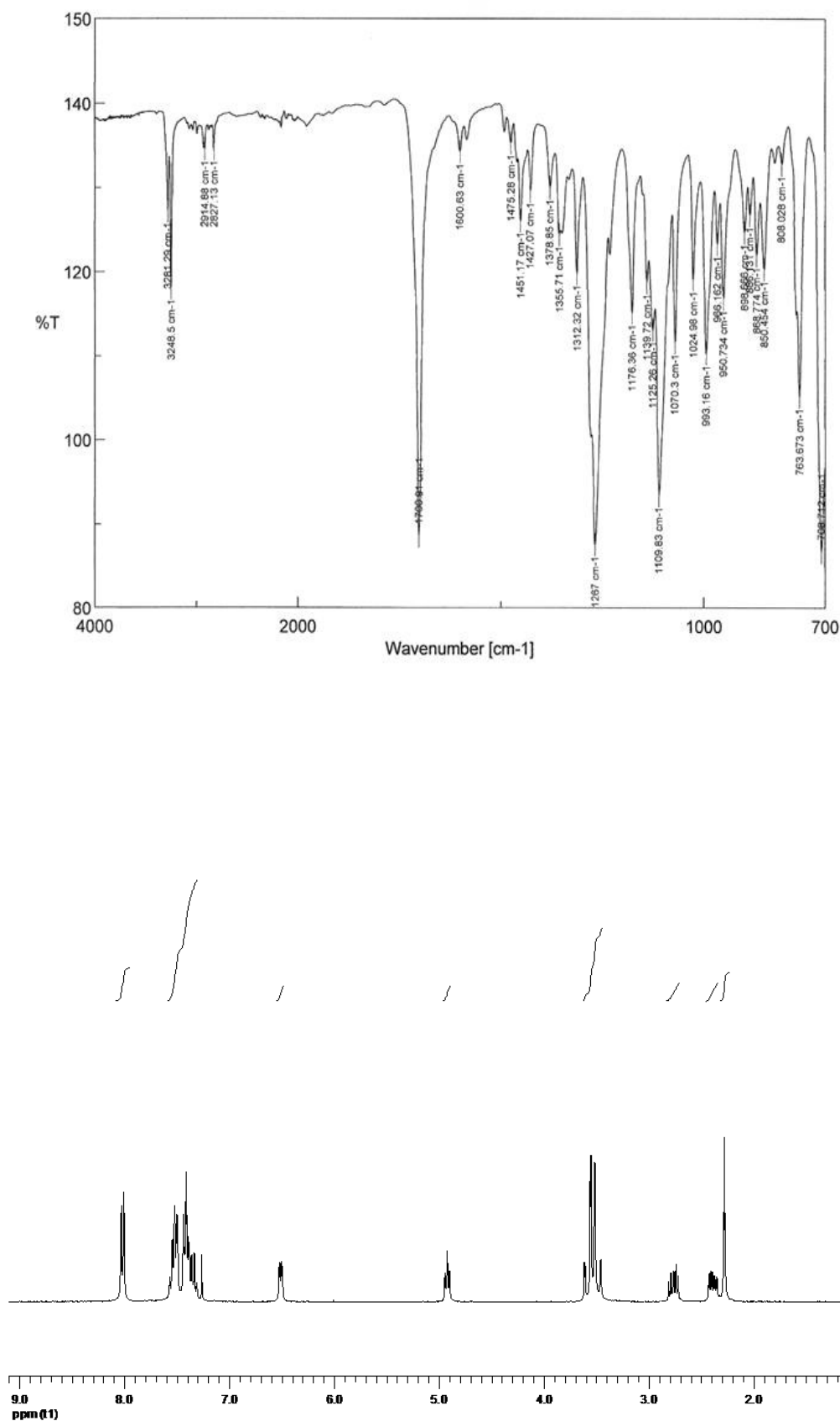
**IR**  $\nu$  = 3281, 3248, 1700, 1267, 1109, 763 cm<sup>-1</sup>.

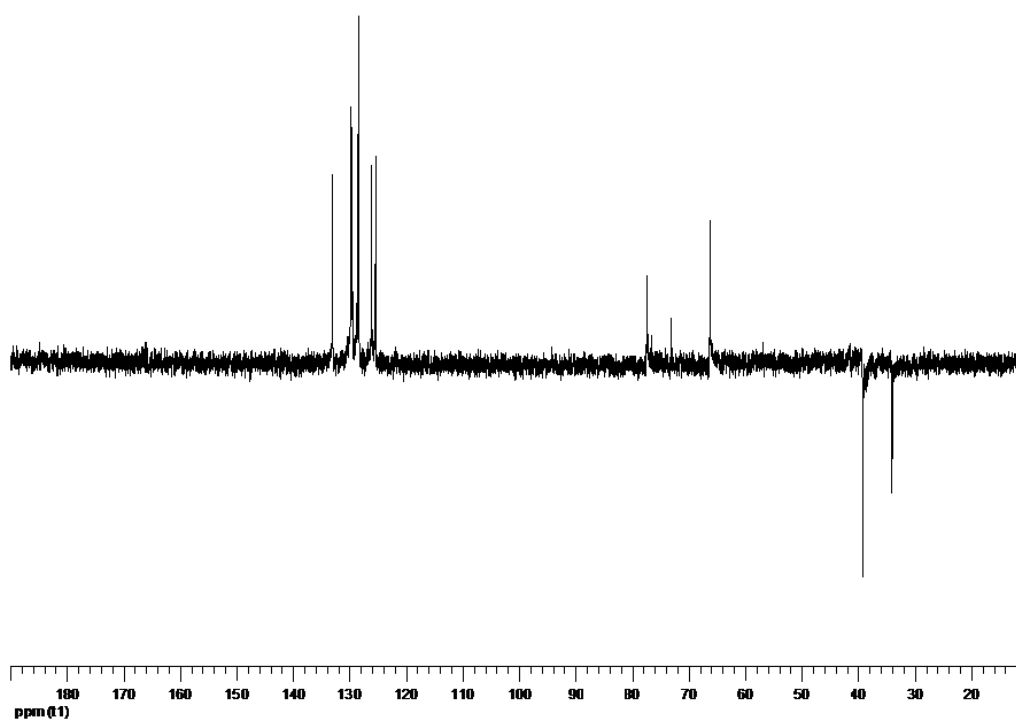
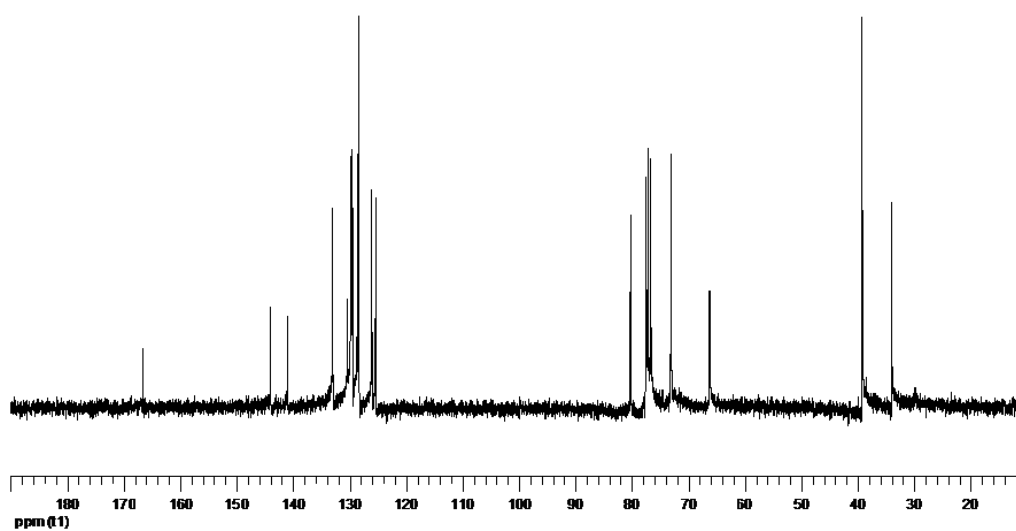
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 8.03-8.00 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.57-7.31 (m, 7H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 4 × H<sub>arom</sub>), 6.51 (dd, 1H, *J* = 7.0, 3.2 Hz, 1-H), 4.92 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, 3-H), 3.61-3.46 (sistema AB, 2H, *J* = 16.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.60-3.45 (sistema AB, 2H, *J* = 16.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.76 (dt, 1H, *J* = 14.4, 6.7 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.58 (ddd, 1H, *J* = 14.4, 7.1, 2.9 Hz, 2 $\beta$ -H), 2.27 (t, 2H, *J* = 2.3 Hz, 2 × CH).

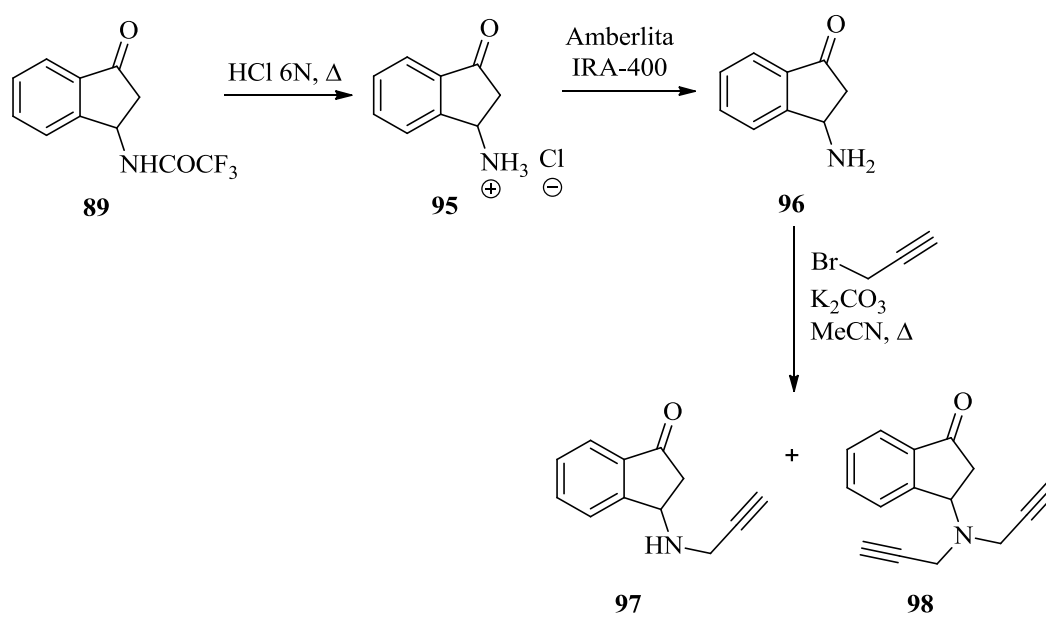
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 166.56 (CO), 143.95 (C-7a), 141.00 (C-3a), 132.95 (C'-4), 130.29 (C'-1), 129.66, 129.46, 128.56, 128.29, 126.02 y 125.35 (4 × CH<sub>arom</sub>, 4 × C'-H), 80.17 (2 × C $\equiv$ CH), 77.27 (C-1), 72.98 (2 × C $\equiv$ CH), 66.13 (C-3), 39.07 (2 × CH<sub>2</sub>), 33.85 (C-2).

**EM (FAB): m/z (%):** 331 (12) [M+2]<sup>+</sup>, 330 (48) [M+1]<sup>+</sup>, 230 (62), 186 (5), 154 (99), 137 (100), 105 (23).

Análisis calculado para C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> (329.39): C 80.22, H 5.81, N 4.25; encontrado C 80.45, H 5.32, N 4.60.

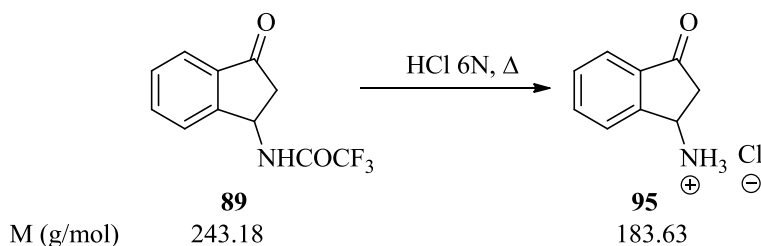








#### 4.12. Clorhidrato de (±)-3-amino-1*H*-indan-1-ona (**95**).



Una disolución de **89** (0.30 g; 1.23 mmol) en 4 mL de HCl 2N se puso a reflujo durante 3 horas. A continuación se eliminó el exceso de disolvente y se lavó el crudo de reacción con MeOH (5 mL). Se formó un sólido beige que fue cristalizado en isopropanol, aislándose **95** (0.21 g; Rdto. 95%), como un sólido blanco.

**Compuesto 95:** Sólido blanco, p.f. 235-237°C.

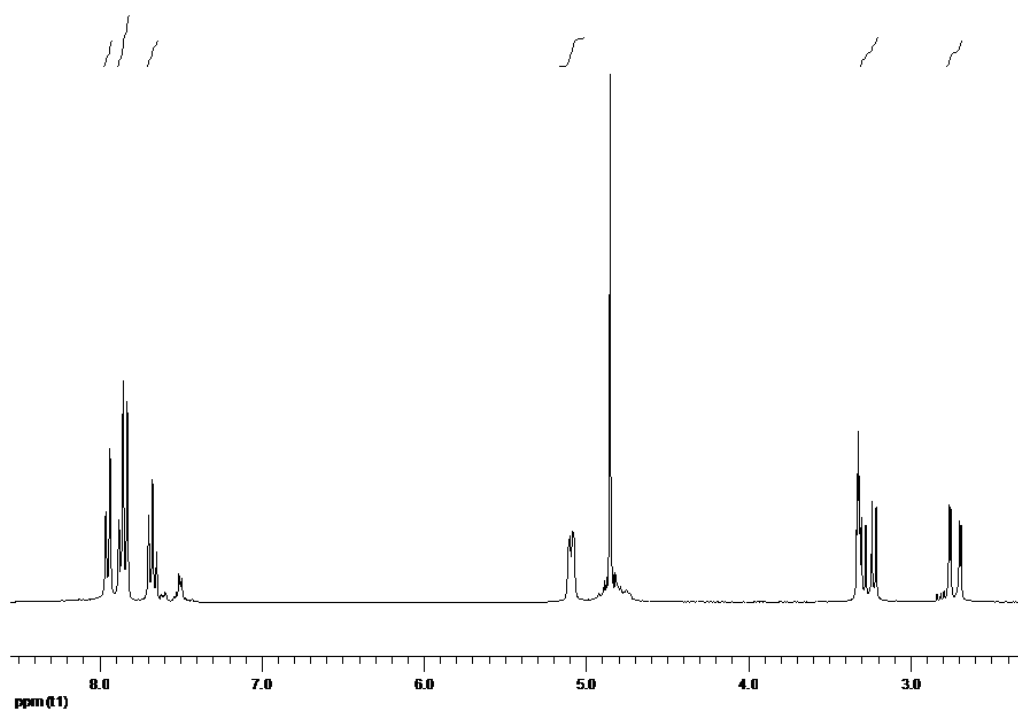
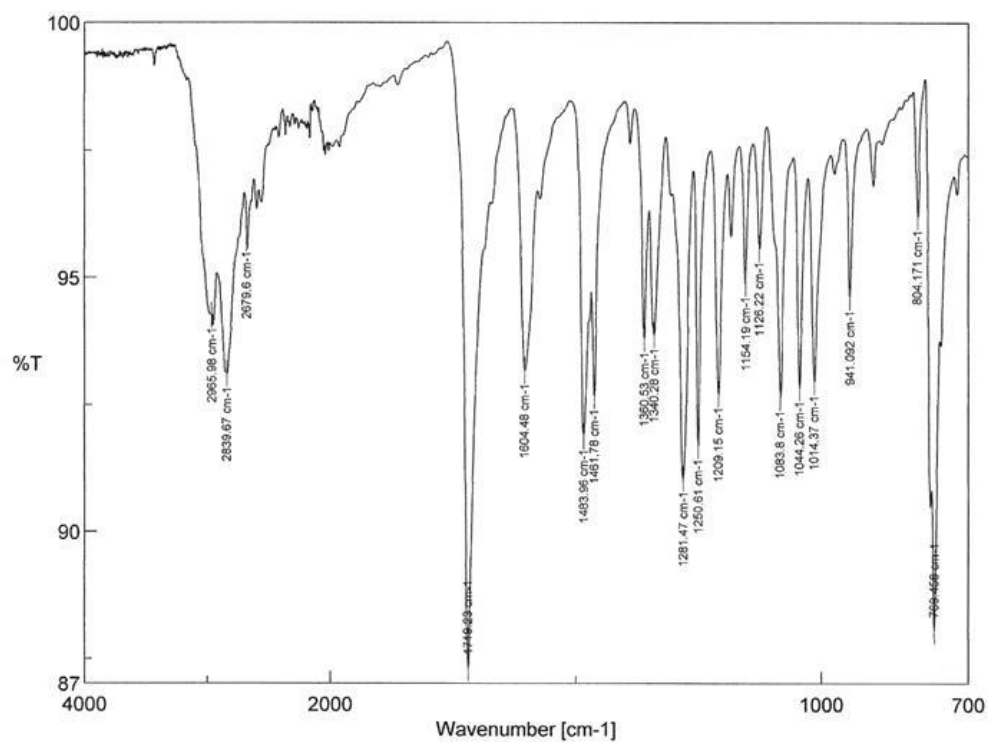
**IR  $\nu$**  = 2965, 2839, 1719, 1483, 1281, 1154, 769  $\text{cm}^{-1}$ .

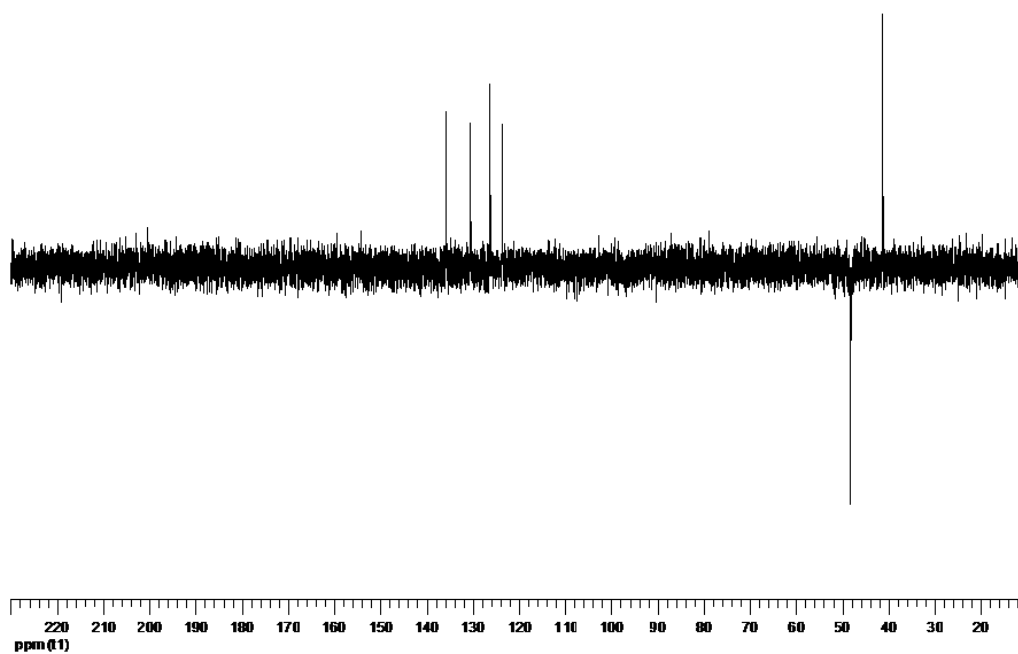
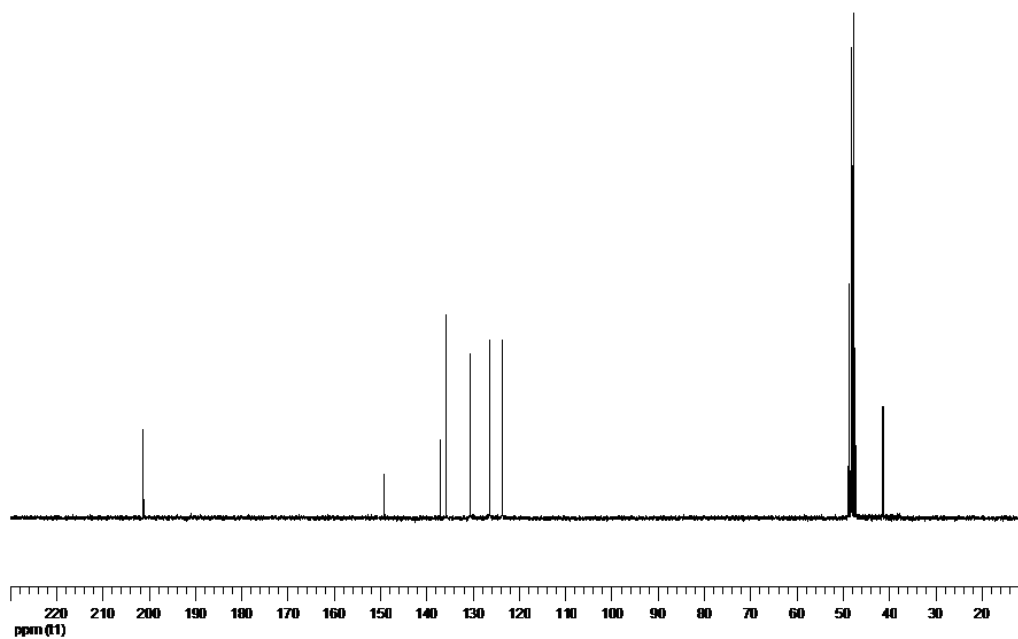
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$**  = 7.96-7.94 (m, 1H, 7-H), 7.88-7.49 (m, 2H, 4-H, 5-H), 7.70-7.49 (m, 1H, 6-H), 5.27 (dd, 1H,  $J$  = 7.1, 2.0 Hz, 3-H), 3.30-2.68 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB}$  = 19.0 Hz,  $J_{AM}$  = 7.7 Hz,  $J_{BM}$  = 2.9 Hz, 2 $\alpha$ -H, 2 $\beta$ -H).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$**  = 201.17 (C-1), 149.00 (C-3a), 137.00 (C-7a), 135.71, 130.46, 126.18 y 123.53 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 48.05 (C-2), 41.10 (C-3).

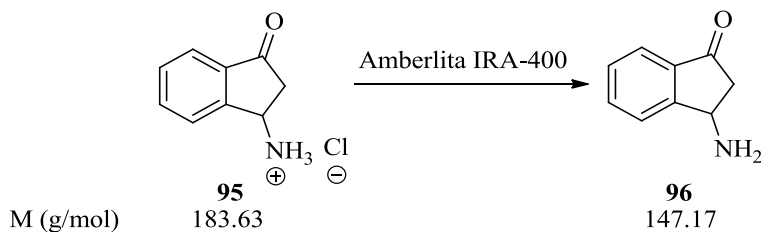
**EM (EI): m/z (%):** 148 (2) [ $\text{M}^+$ -HCl], 147 (31), 146 (100), 130 (10), 118 (14), 104 (36), 77 (42).

Análisis calculado para  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClNO}$  (183.63): C 58.86, H 5.49, N 7.63; encontrado C 58.65, H 5.78, N 7.72.





**4.13. (±)-3-Amino-1H-indan-1-ona (96).**



Una disolución de **95** (0.66 g; 3.6 mmol) en MeOH (5 mL) se pasó a través de una columna empaquetada con una resina intercambiadora de iones, Amberlita IRA-400 (Cl<sup>-</sup>) (5 mL), en H<sub>2</sub>O, previamente activada con NaOH 2N y H<sub>2</sub>O hasta pH 6, y se procedió a eluir con MeOH (40 mL). La solución eluída se concentró bajo presión reducida obteniéndose **96** (0.34 g; Rdto. 64%), como un sólido amarillo.

**Compuesto 96:** Sólido amarillo, p.f. 256-259°C.

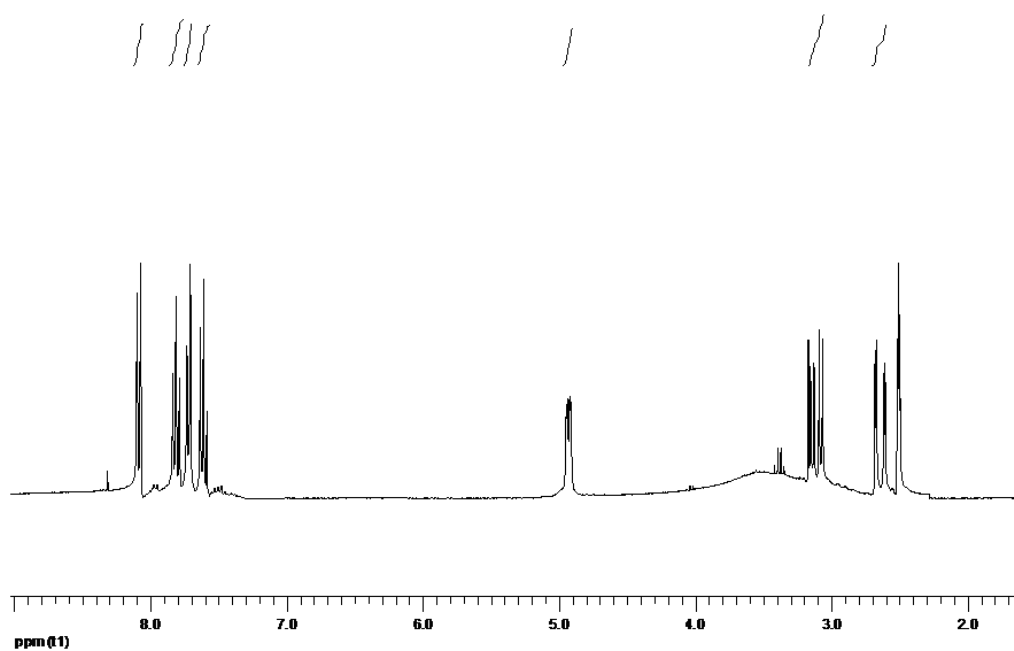
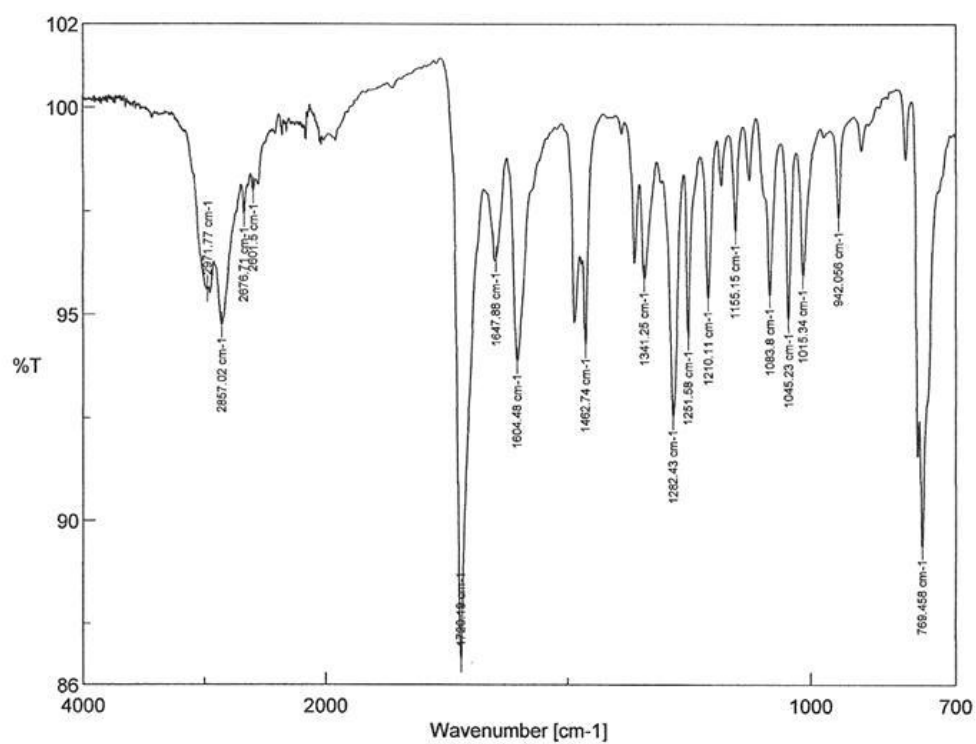
**IR  $\nu$**  = 2971, 2857, 1720, 1462, 1282, 1045 cm<sup>-1</sup>.

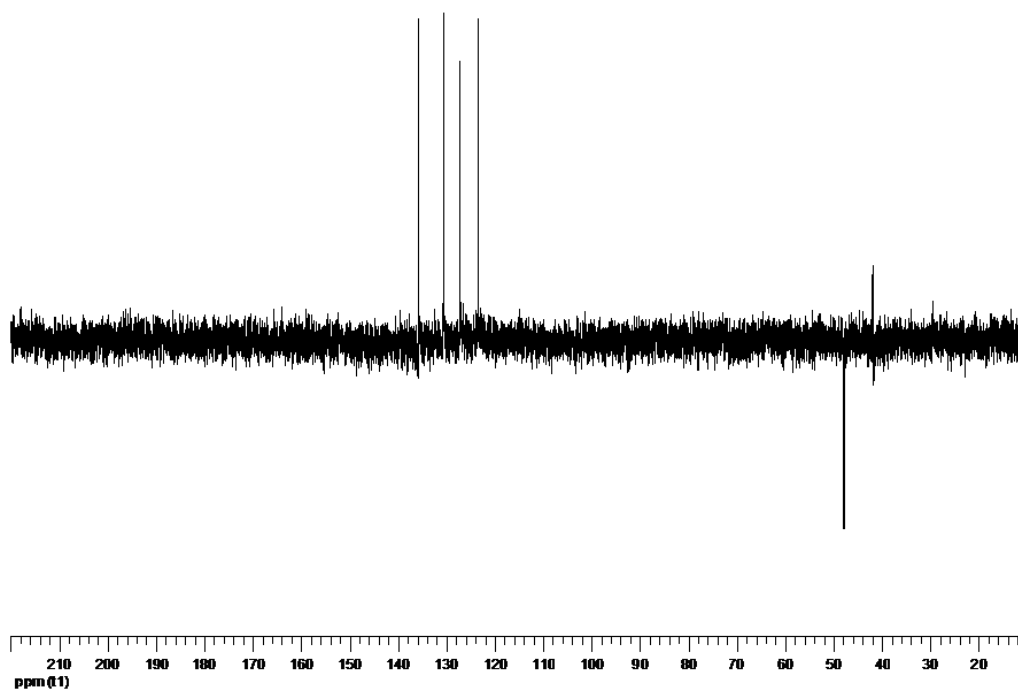
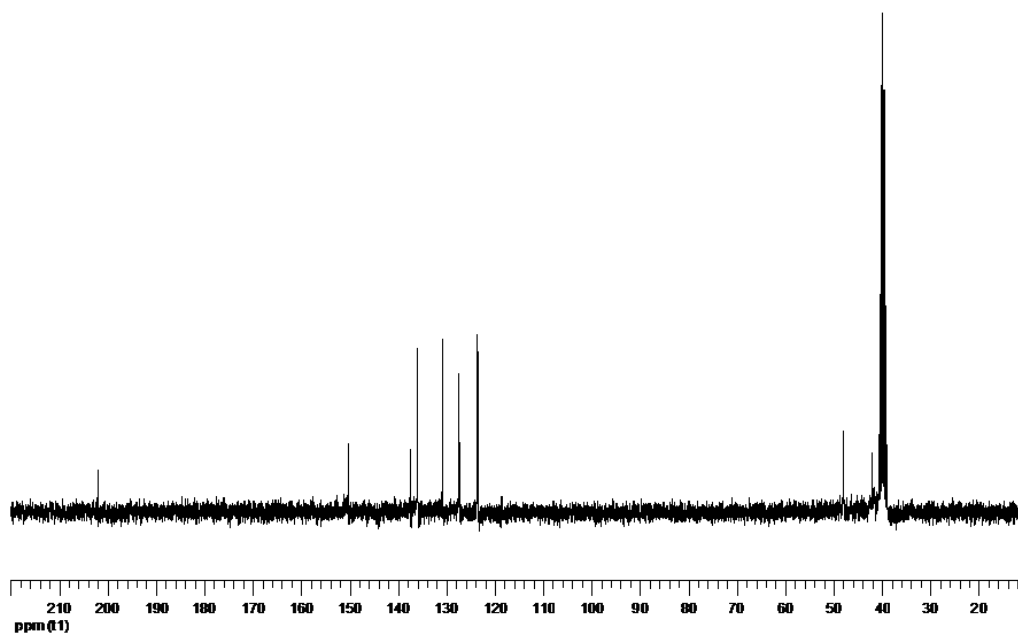
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta$  = 8.30-8.06 (m, 1H, 7-H), 7.82-7.77 (m, 1H, 5-H), 7.72-7.69 (m, 1H, 4-H), 7.62-7.57 (m, 1H, 6-H), 4.91 (dd, 1H,  $J$  = 7.3, 2.6 Hz, 3-H), 3.35 (s. an., 2H, intercambian con D<sub>2</sub>O, NH<sub>2</sub>), 3.13-2.58 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB}$  = 18.9 Hz,  $J_{AM}$  = 7.6 Hz,  $J_{BM}$  = 3.2 Hz, 2 $\alpha$ -H, 2 $\beta$ -H).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*)**  $\delta$  = 202.03 (C-1), 150.23 (C-3a), 137.31 (C-7a), 135.84, 130.64, 127.28 y 123.48 (CH<sub>arom</sub>), 47.75 (C-2), 41.80 (C-3).

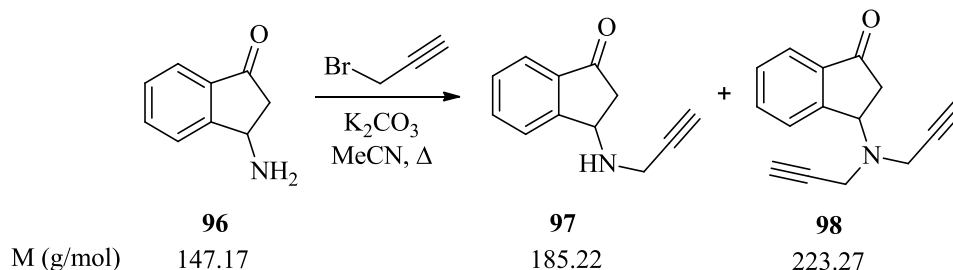
**EM (EI): m/z (%):** 148 (8) [M+1]<sup>+</sup>, 147 (49) [M]<sup>+</sup>, 146 (100) [M-1]<sup>+</sup>, 129 (6) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 118 (11), 104 (21), 77 (19).

Análisis calculado para C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO (147.17): C 73.45, H 6.16, N 9.52; encontrado C 73.23, H 6.41, N 9.69.





**4.14. (±)-3-(N-Propargilamino)-1-indanona (97) y (±)-3-(N,N-Dipropargilamino)-1-indanona (98).**



Sobre una mezcla de **96** (0.20 g; 1.36 mmol) y  $K_2CO_3$  (0.18 g, 1.36 mmol) en MeCN anhidro (10 mL), bajo atmósfera de argón, se adicionó bromuro de propargilo (0.15 mL, 1.36 mmol), gota a gota, y se refluyó durante 24 horas, finalizadas las cuales se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío y se disolvió el residuo obtenido en AcOEt (10 mL). La fase orgánica se lavó con una solución de NaOH 2N ( $3 \times 10$  mL) y posteriormente se secó con  $Na_2SO_4$  anhidro y se eliminó el exceso de disolvente por rotación a vacío, aislándose un aceite amarillo que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (13 g), Hexano/AcOEt (5:1), obteniéndose en primer lugar **98** (0.110 g, Rdto. 37%) como un sólido amarillo y posteriormente **97** (0.120 g, Rdto. 48%) como un sólido marrón.

**Compuesto 97:** Sólido marrón, p.f. 81-83°C.

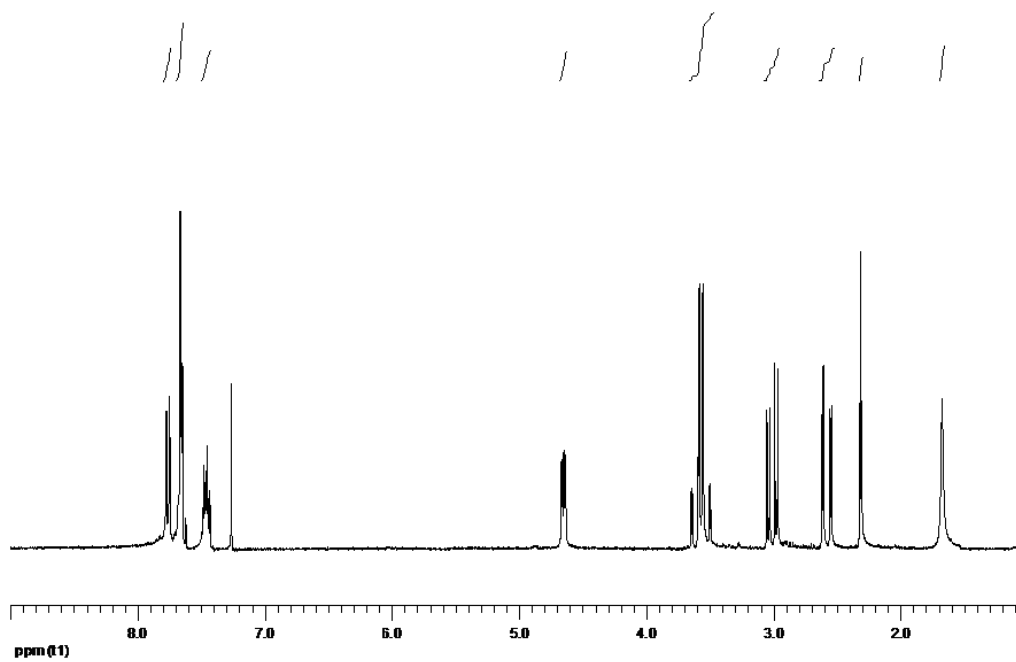
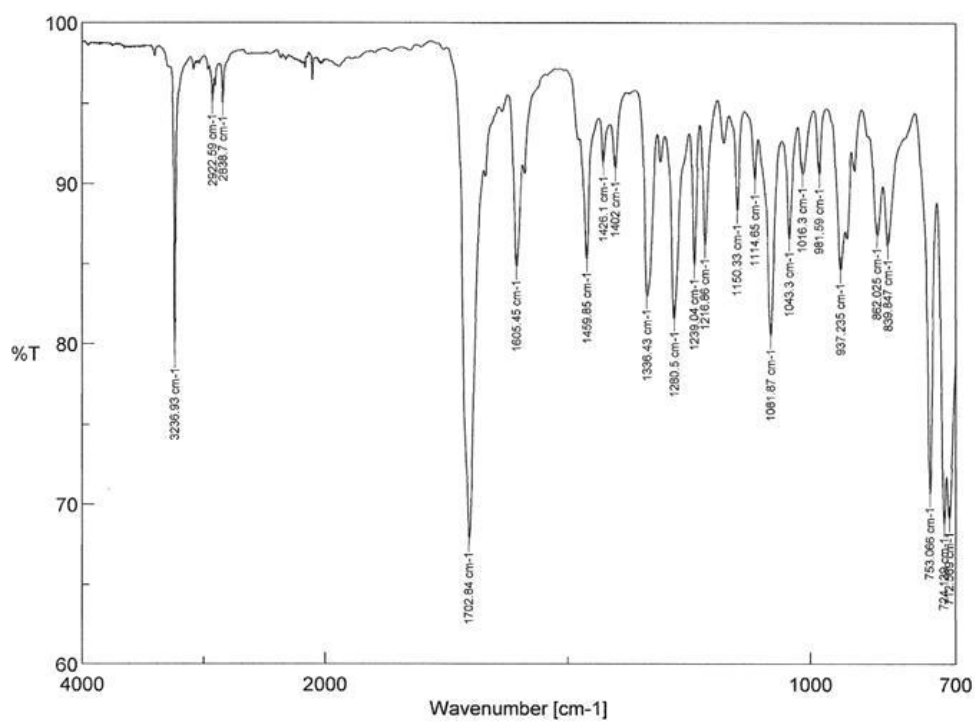
**IR**  $\nu$  = 3236, 1702, 1336, 1280, 1081  $cm^{-1}$ .

**$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  = 7.77-7.75 (m, 1H, 7-H), 7.66-7.64 (m, 2H, 4-H, 5-H), 7.48-7.43 (m, 1H, 6-H), 4.65 (dd, 1H,  $J$  = 6.7, 2.9 Hz, 3-H), 3.64-3.50 (sistema AB, 1H,  $J$  = 17.0 Hz,  $CH_2$ ), 3.63-3.49 (sistema AB, 1H,  $J$  = 17.0 Hz,  $CH_2$ ), 3.04-2.54 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB}$  = 18.7 Hz,  $J_{AM}$  = 6.7 Hz,  $J_{BM}$  = 2.9 Hz, 2 $\alpha$ -H, 2 $\beta$ -H), 2.31 (t, 1H,  $J$  = 2.4 Hz, CH), 1.67 (s. an., 1H, intercambia con  $D_2O$ , NH).

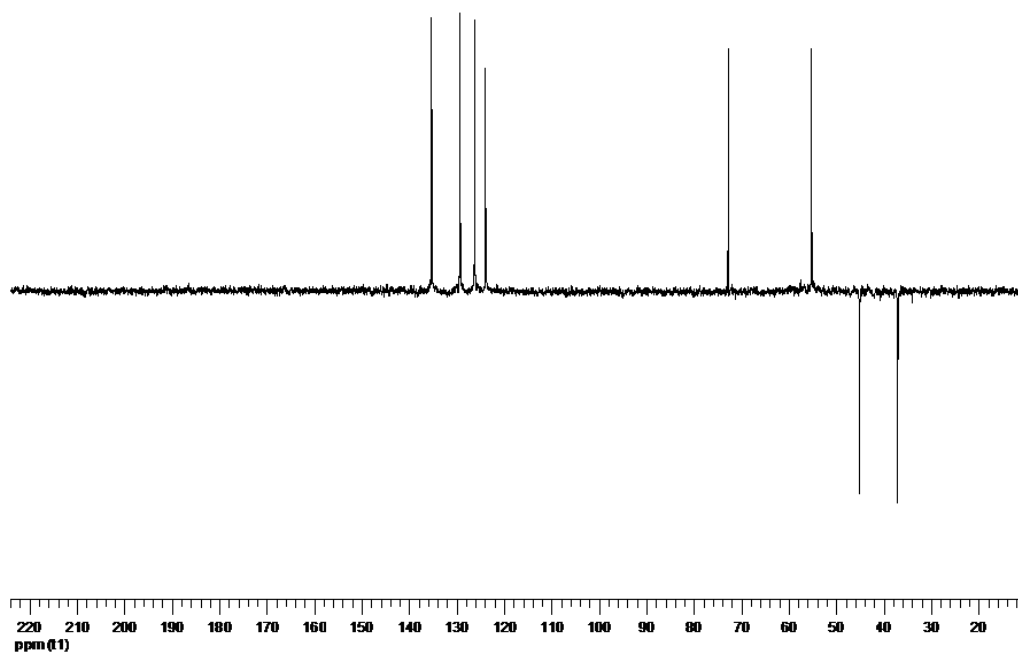
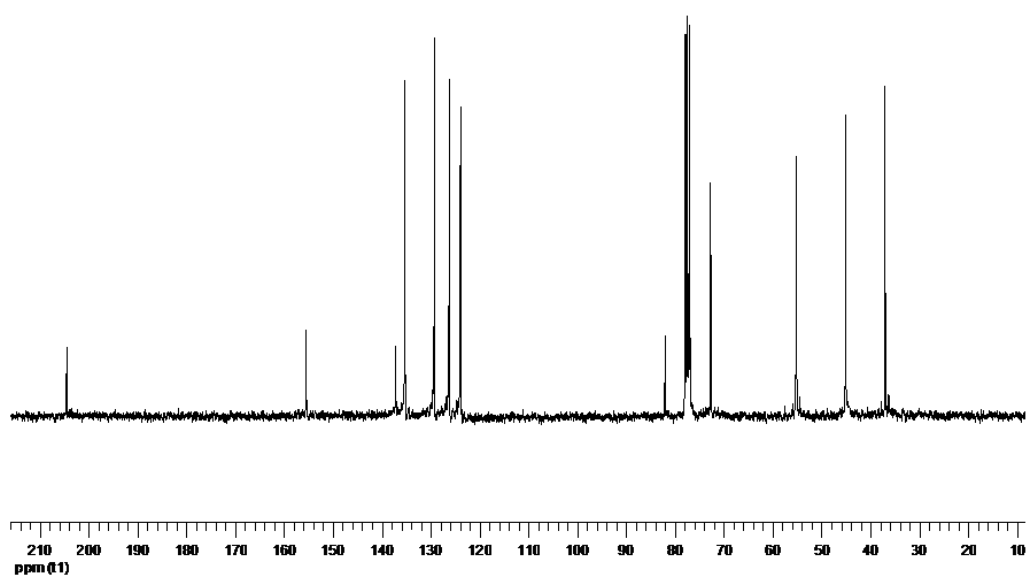
**$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  = 204.51 (C-1), 155.41 (C-3a), 137.08 (C-7a), 135.19, 129.17, 126.12 y 123.82 ( $CH_{arom}$ ), 81.92 ( $C\equiv CH$ ), 72.56 (C-3), 55.04 ( $C\equiv CH$ ), 44.91 ( $CH_2$ ), 36.83 (C-2).

**EM (EI): m/z (%):** 186 (6)  $[M+1]^+$ , 185 (42)  $[M]^+$ , 184 (100)  $[M-1]^+$ , 168 (14)  $[M^+-H_2O]$ , 145 (17)  $[(M-2)^+-propargilo]$ , 131 (7), 118 (43), 77 (41).

Análisis calculado para  $C_{12}H_{11}NO$  (185.22): C 77.81, H 5.99, N 7.56; encontrada C 77.65, H 6.14, N 7.69.







**Compuesto 98:** Sólido amarillo, p.f. 85-87°C.

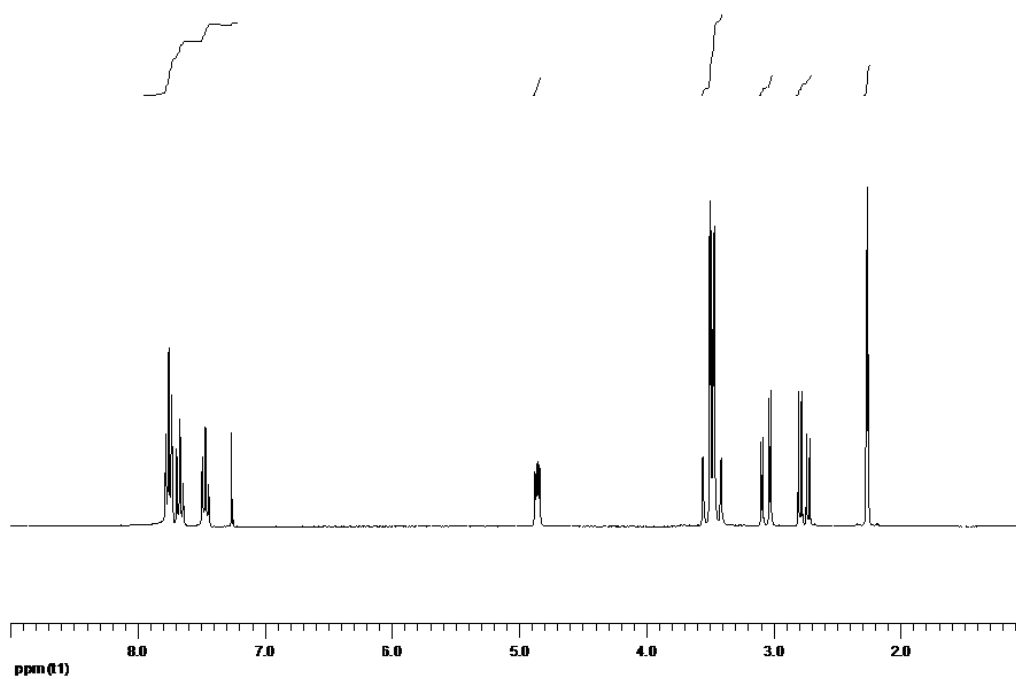
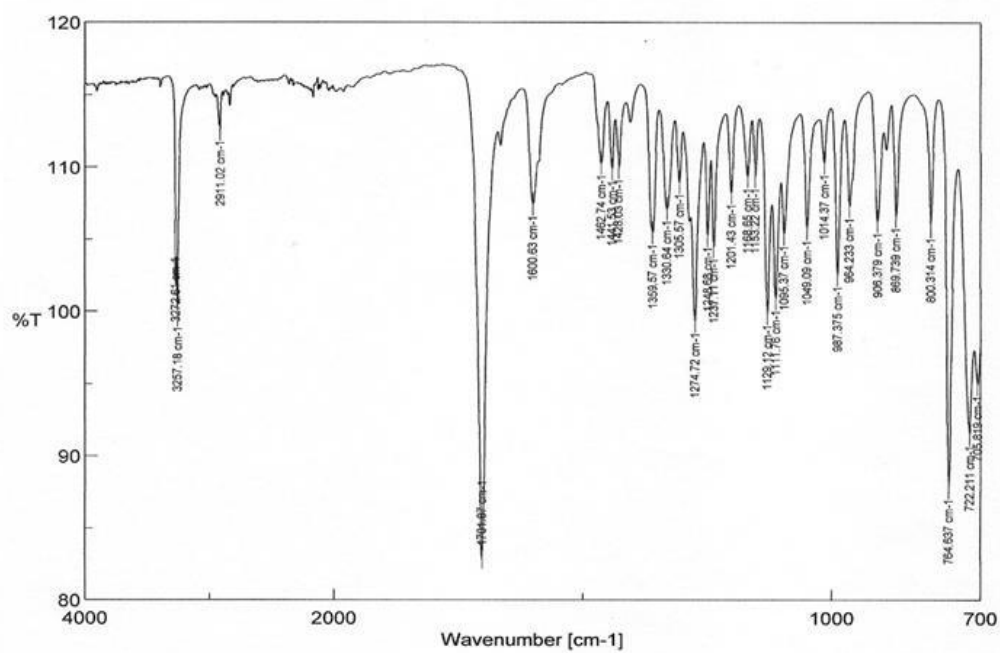
**IR**  $\nu$  = 3257, 2911, 1274, 1129, 1049  $\text{cm}^{-1}$ .

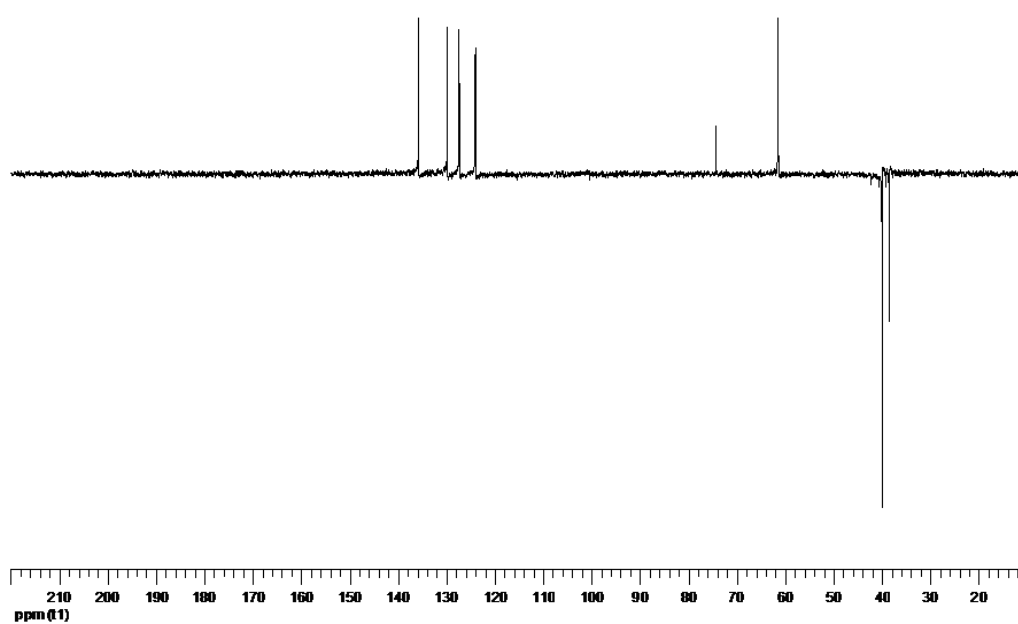
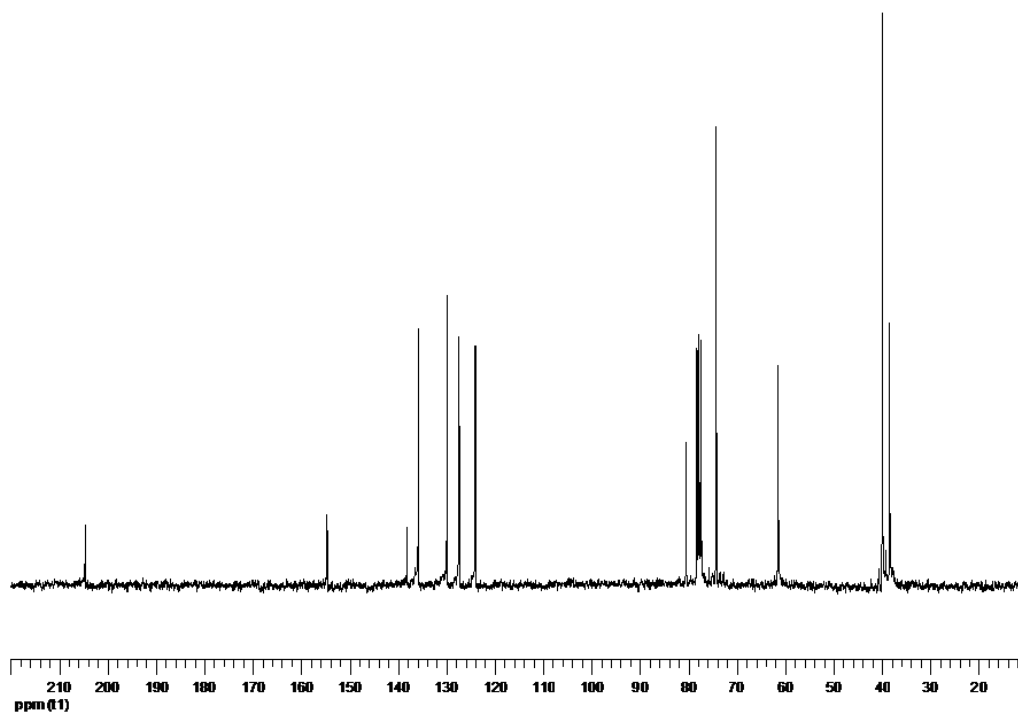
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 7.78-7.73 (m, 2H, 5-H, 7-H), 7.69-7.64 (m, 1H, 4-H), 7.49-7.44 (m, 1H, 6-H), 4.85 (dd, 1H,  $J$  = 7.1, 3.5 Hz, 3-H), 3.55-3.41 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.9 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.54-3.40 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.9 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.09-2.71 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB}$  = 19.1 Hz,  $J_{AM}$  = 7.1 Hz,  $J_{BM}$  = 3.5 Hz, 2 $\alpha$ -H, 2 $\beta$ -H), 2.26 (t, 2H,  $J$  = 2.5 Hz, 2  $\times$  CH).

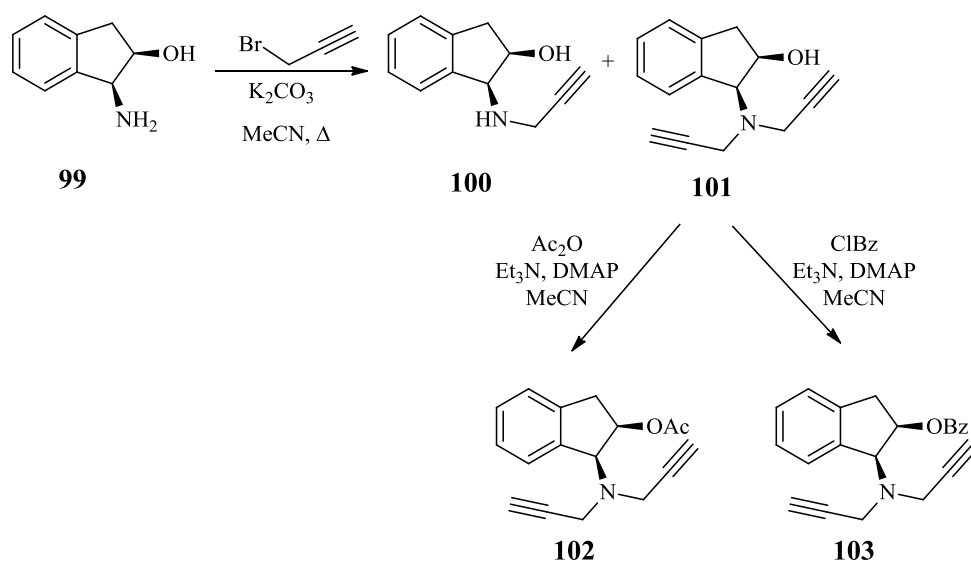
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 204.66 (C-1), 154.59 (C-3a), 138.01 (C-7a), 135.69, 129.74, 127.28 y 123.94 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 80.34 (2  $\times$   $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 74.10 (2  $\times$   $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 61.28 (C-3), 39.75 (2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 38.25 (C-2).

**EM (EI): m/z (%):** 225 (9)  $[\text{M}+2]^+$ , 224 (2)  $[\text{M}+1]^+$ , 223 (1)  $[\text{M}]^+$ , 222 (1)  $[\text{M}-1]^+$ , 204 (2)  $[(\text{M}-1)^+-\text{H}_2\text{O}]$ , 183 (18)  $[(\text{M}-1)^+-\text{propargilo}]$ , 141 (32), 113 (42), 71 (100).

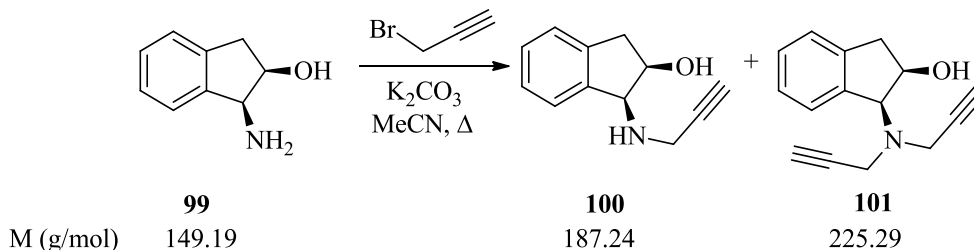
Análisis calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}$  (223.27): C 80.69, H 5.87, N 6.27; encontrada C 80.42, H 6.13, N 6.39.







**4.15. (1S,2R)-(+)-cis-1-(N-Propargilamino)-2-indanol (100) y (1S,2R)-(+)-cis-1-(N,N-Dipropargilamino)-2-indanol (101).**



Sobre una mezcla de **99** (0.20 g, 1.34 mmol) y  $K_2CO_3$  (0.18 g, 1.34 mmol) en MeCN anhidro (7 mL), bajo atmósfera de argón y a 0°C, se adicionó bromuro de propargilo (0.30 mL, 2.68 mmol), gota a gota, y se reflujo durante 24 horas. A continuación se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío y se disolvió el residuo obtenido en AcOEt (10 mL) y se lavó con una solución de NaOH 2N ( $3 \times 10$  mL). La fase orgánica resultante se secó con  $Na_2SO_4$  anhidro y se eliminó el exceso de disolvente por rotación a vacío, aislándose un sólido blanco que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (10 g), Hexano/AcOEt (3:1), obteniéndose en primer lugar **101** (0.17 g, Rdto. 56%) como un sólido blanco y a continuación **100** (0.09 g, Rdto. 36%) como un sólido blanco.

**Compuesto 100:** Sólido blanco, p.f. 106-108°C.

$[\alpha]_D^{25} = +38^\circ$  (25°C, 0.25,  $CHCl_3$ ).

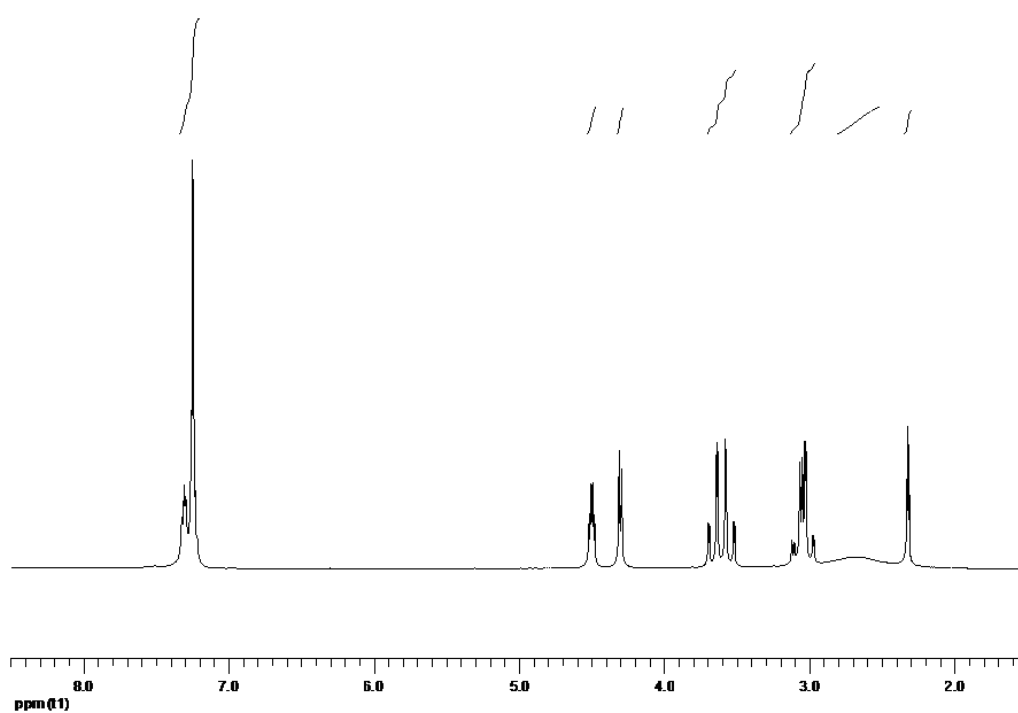
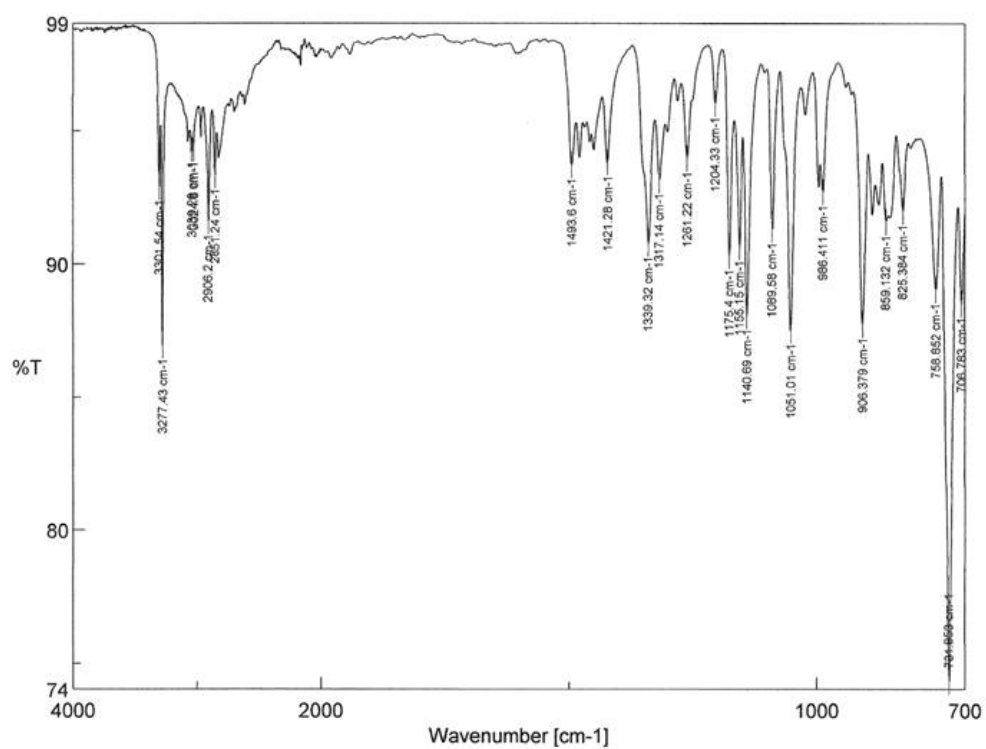
**IR**  $\nu$  = 3277, 2906, 1421, 1339, 1140, 1051, 731  $cm^{-1}$ .

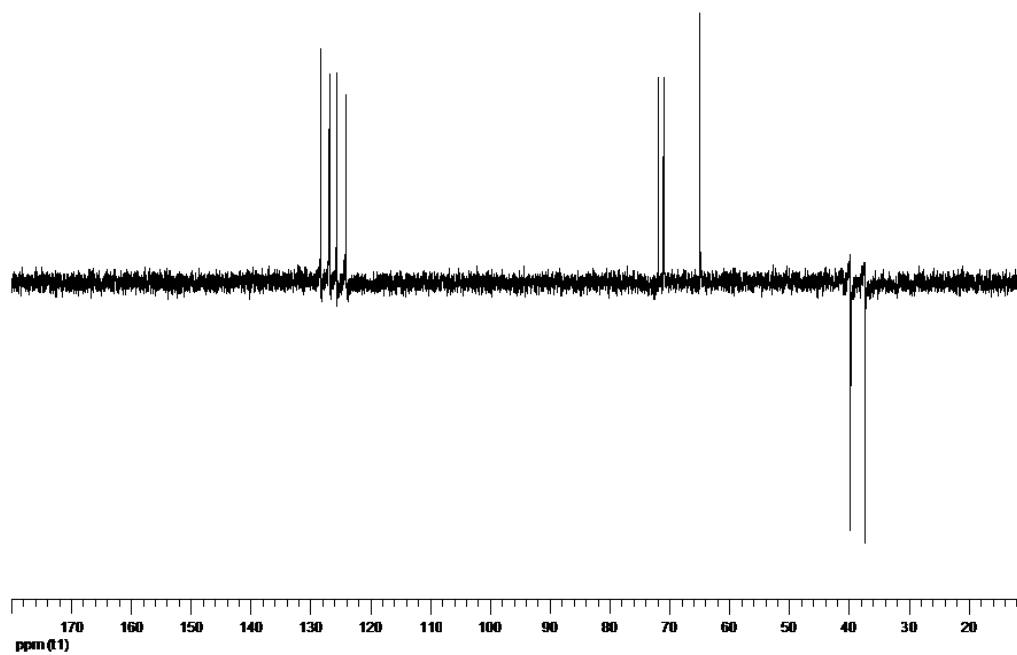
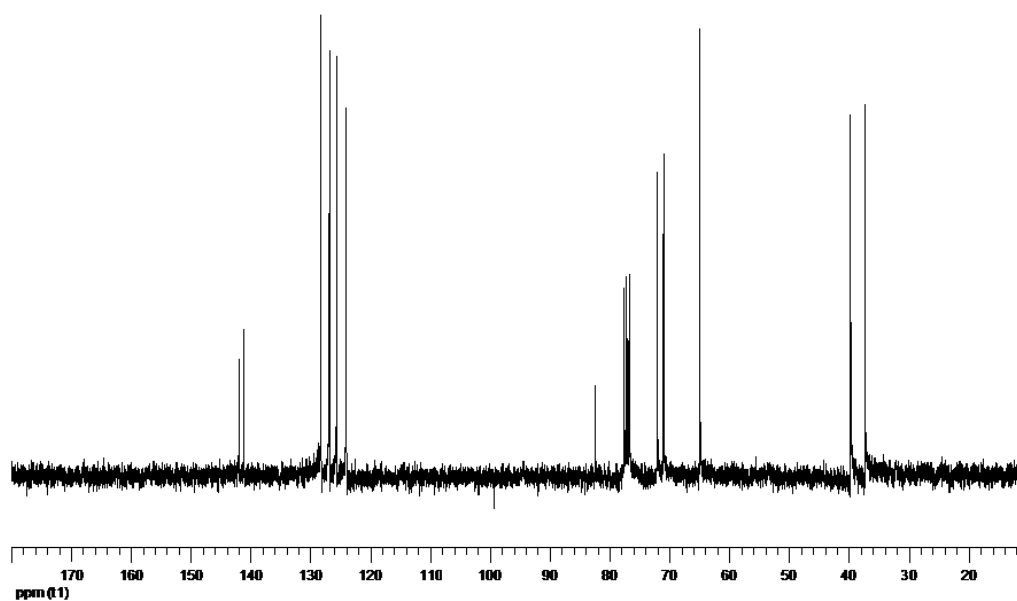
**$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  = 7.32-7.22 (m, 4H,  $H_{arom}$ ), 4.51-4.47 (m, 1H, 2-H), 4.31-4.29 (m, 1H, 1-H), 3.69-3.52 (sistema AB, 1H,  $J$  = 17.2 Hz,  $CH_2$ ), 3.68-3.51 (sistema AB, 1H,  $J$  = 17.2 Hz,  $CH_2$ ), 3.11-2.96 (m, 2H,  $3\alpha$ -H,  $3\beta$ -H), 2.67 (s.an., 1H, intercambia con  $D_2O$ , OH), 2.31 (t, 1H,  $J$  = 2.2 Hz, CH).

**$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  = 141.85 (C-3a), 141.05 (C-7a), 128.17, 126.79, 125.58 y 123.94 ( $CH_{arom}$ ), 82.27 ( $C\equiv CH$ ), 71.90 (C-2), 70.87 ( $C\equiv CH$ ), 64.78 (C-1), 39.59 ( $CH_2$ ), 37.16 (C-3).

**EM (EI): m/z (%):** 186 (2)  $[M-1]^+$ , 168 (5)  $[M^+-H_2O]$ , 148 (100)  $[M^+-propargilo]$ , 130 (21), 115 (10), 103 (31), 77 (11).

Análisis calculado para  $C_{12}H_{13}NO$  (187.24): C 76.98, H 7.00, N 7.48; encontrado C 76.63, H 7.12, N 7.36.







**Compuesto 101:** Sólido blanco, p.f. 106-109°C.

$[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = +72^\circ$  (25°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

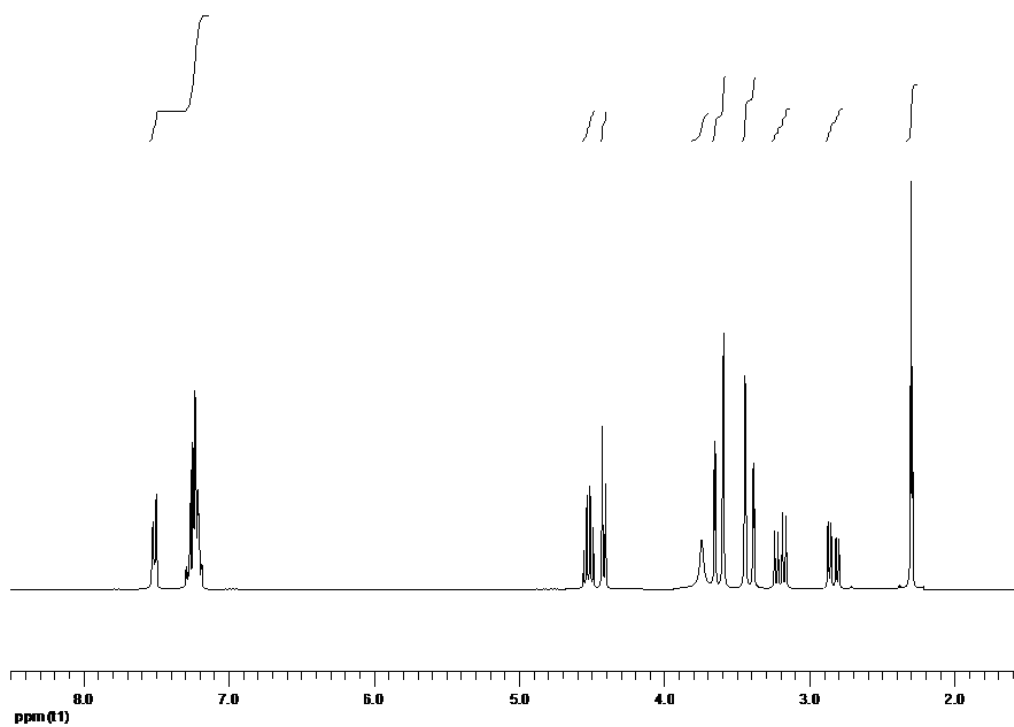
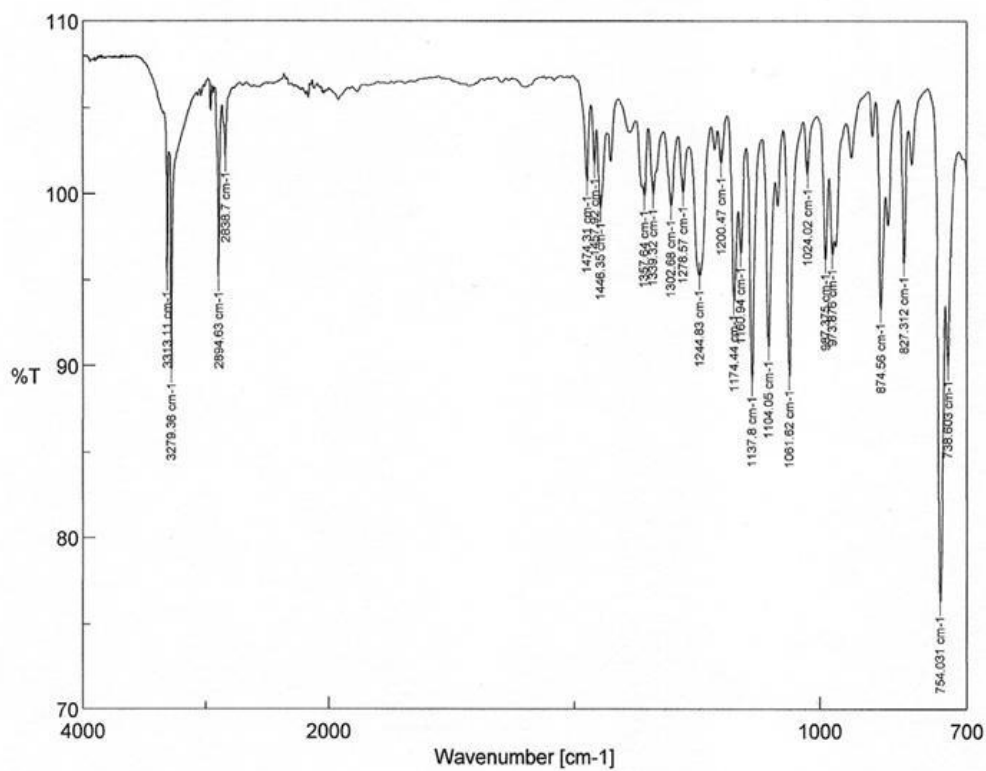
**IR**  $\nu$  = 3279, 2894, 1339, 1244, 1137 cm<sup>-1</sup>.

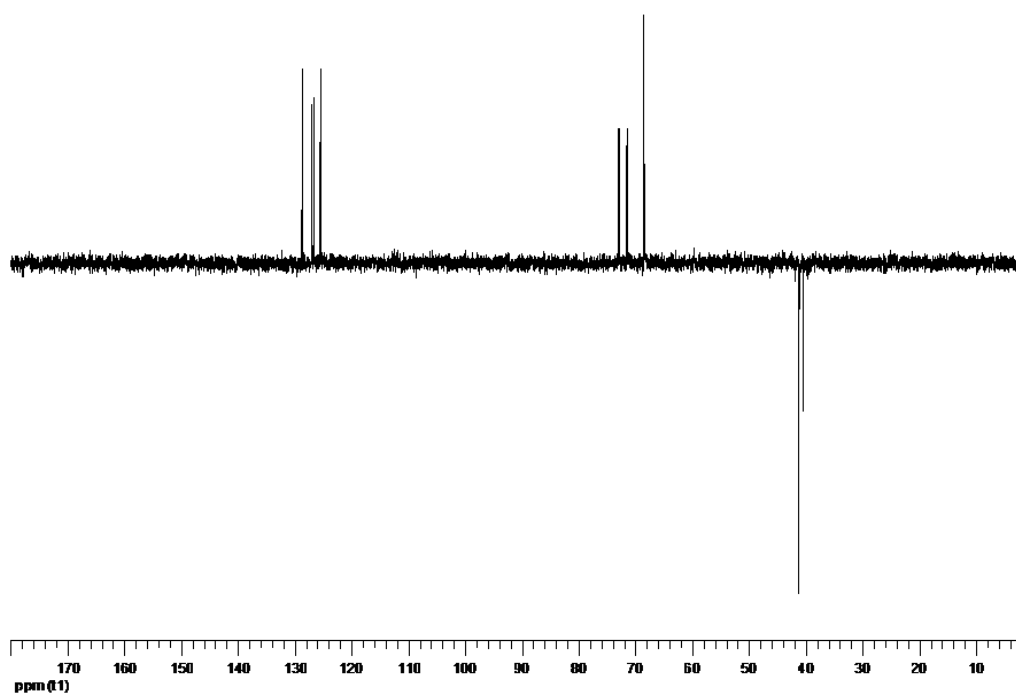
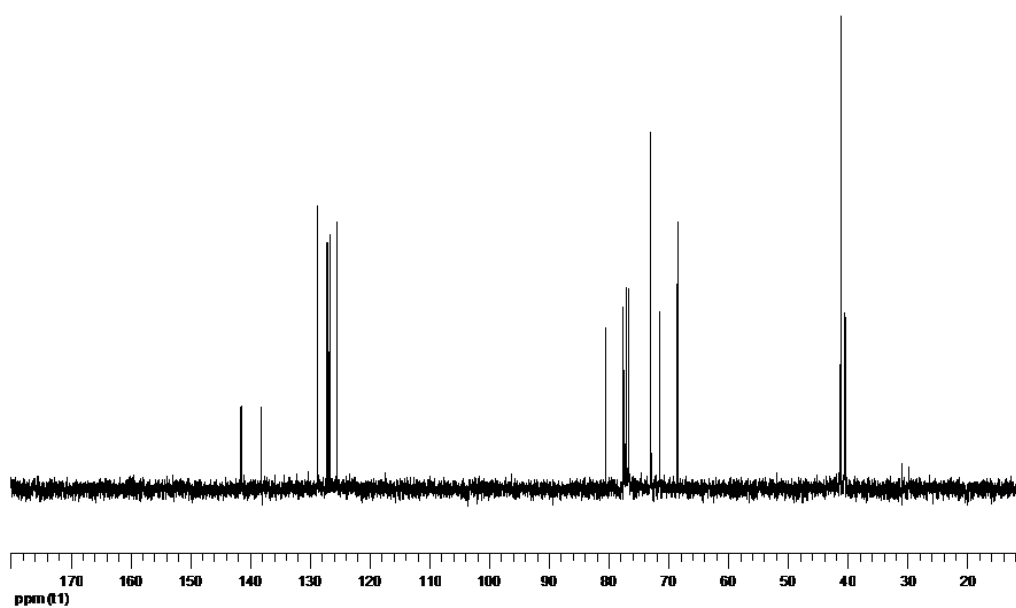
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.52-7.50 (m, 1H, 7-H), 7.29-7.18 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 4.52 (dd, 1H,  $J$  = 13.2, 6.9 Hz, 2-H), 4.42-4.40 (m, 1H, 1-H), 3.74 (s. an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, OH), 3.65-3.39 (sistema AB, 2H,  $J$  = 17.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.64-3.38 (sistema AB, 2H,  $J$  = 17.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.24-2.79 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB}$  = 16.4 Hz,  $J_{AM}$  = 7.2 Hz,  $J_{BM}$  = 6.1 Hz, 3 $\alpha$ -H, 3 $\beta$ -H), 2.29 (t, 2H,  $J$  = 2.3 Hz, 2  $\times$  CH).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 141.47 (C-3a), 138.15 (C-7a), 128.68, 127.04, 126.65 y 125.46 (CH<sub>arom</sub>), 80.37 (2  $\times$  C $\equiv$ CH), 72.87 (C-2), 71.39 (2  $\times$  C $\equiv$ CH), 68.37 (C-1), 41.04 (2  $\times$  CH<sub>2</sub>), 40.31 (C-3).

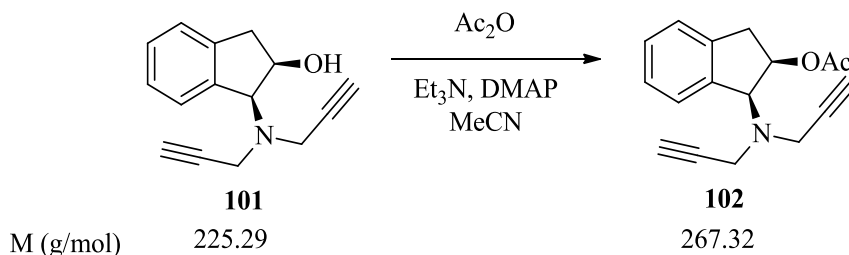
**EM (EI): m/z (%)**: 226 (2) [M+1]<sup>+</sup>, 225 (5) [M]<sup>+</sup>, 224 (4) [M-1]<sup>+</sup>, 208 (2) [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O], 186 (100) [(M-1)<sup>+</sup>-propargilo], 133 (32), 116 (35), 77 (29).

Análisis calculado para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO (225.29): C 79.97, H 6.71, N 6.22; encontrado C 79.81, H 6.92, N 6.29.





#### 4.16. Acetato de (1S,2R)-(-)-cis-1-(N,N-dipropargilamino)-2-indanilo (**102**).



Sobre una disolución de **101** (0.08 g, 0.36 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP en MeCN anhidro (5 mL), bajo atmósfera de argón y a 0°C, se adicionó, gota a gota, Et<sub>3</sub>N (100 µL, 0.72 mmol) y ácido acético (66 µL, 0.72 mmol). A continuación la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, finalizadas las cuales se evaporó el exceso de disolvente y el residuo obtenido se disolvió en AcOEt (10 mL), se extrajo con H<sub>2</sub>O (3 × 10 mL) y posteriormente con una solución saturada de NaCl (3 × 10 mL). La fase orgánica resultante se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminó el exceso de disolvente a vacío, obteniéndose **102** (0.076 g, Rdto. 80%) como un sólido blanco.

**Compuesto 102:** Sólido blanco, p.f. 52-53°C.

$[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = -70.6^\circ$  (25°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

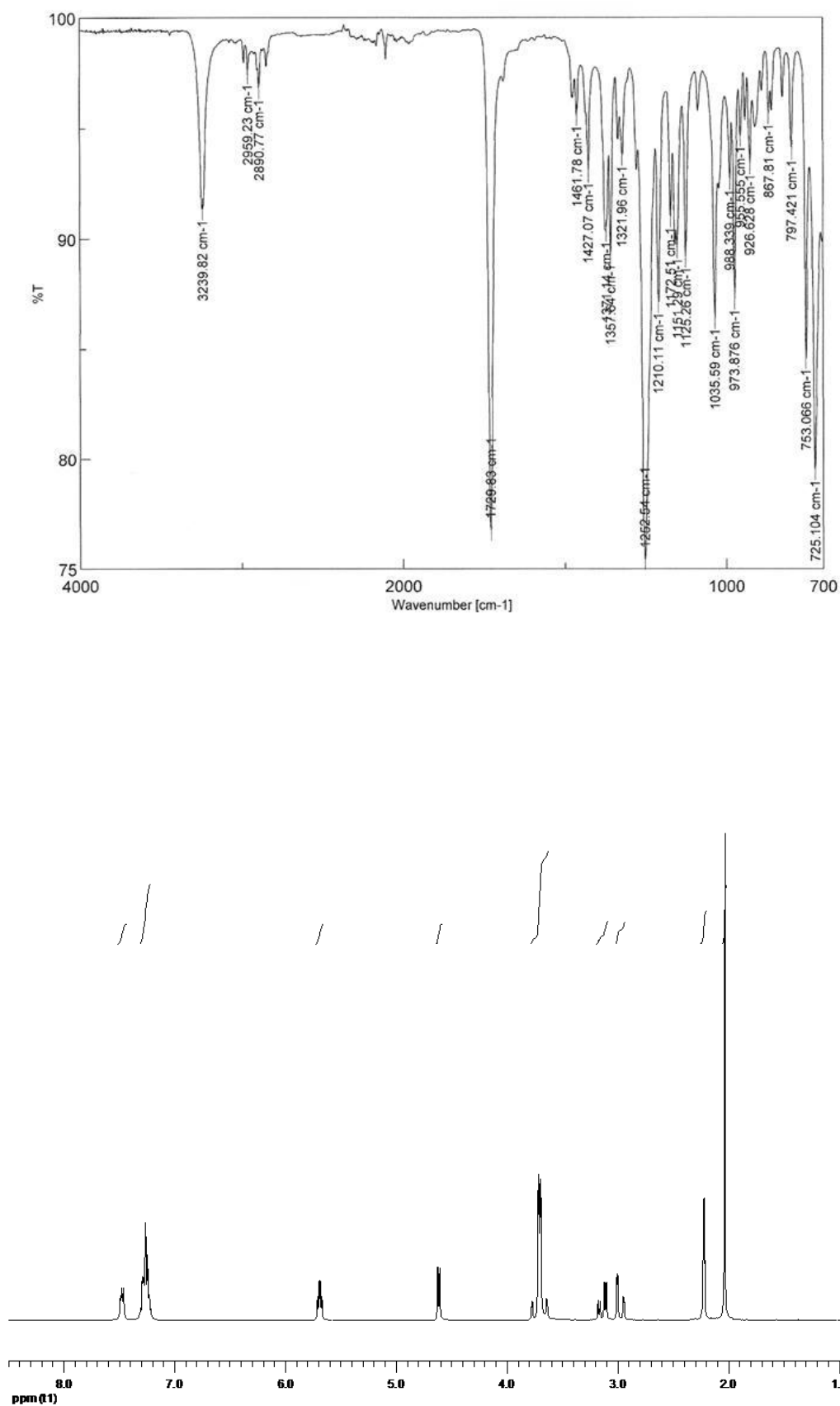
IR  $\nu = 3239, 2890, 1729, 1210, 1035 \text{ cm}^{-1}$ .

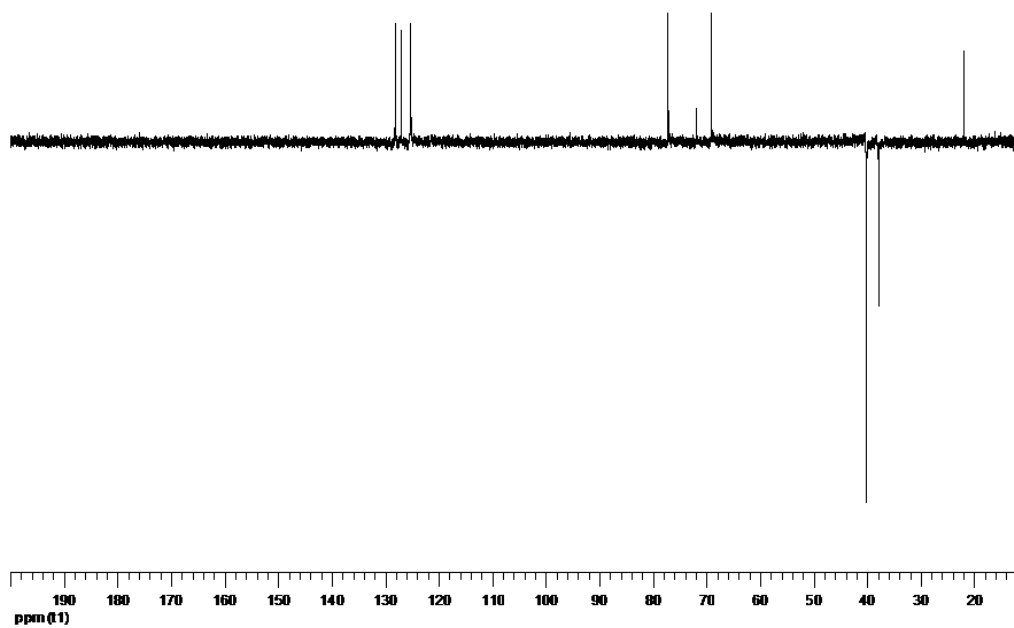
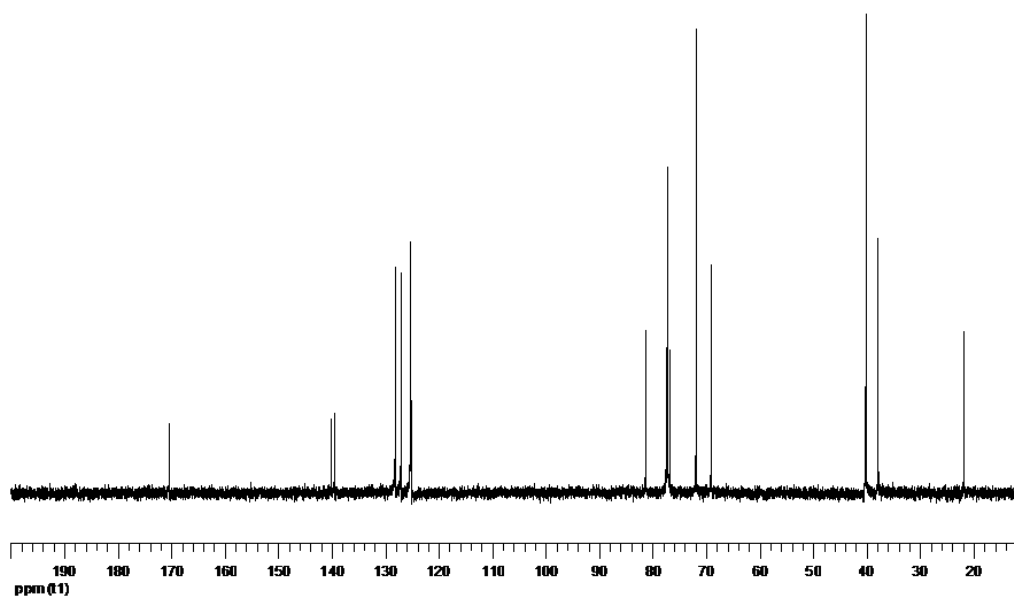
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 7.49\text{--}7.46$  (m, 1H, 7-H), 7.31-7.21 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 5.68 (dt, 1H,  $J = 5.4, 2.4$  Hz, 2-H), 4.61 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz, 1-H), 3.77-3.63 (sistema AB, 2H,  $J = 17.5$  Hz, CH<sub>2</sub>), 3.76-3.62 (sistema AB, 2H,  $J = 17.3$  Hz, CH<sub>2</sub>), 3.17-2.93 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB} = 17.2$  Hz,  $J_{AM} = 5.7$  Hz,  $J_{BM} = 2.5$  Hz, 3 $\alpha$ -H, 3 $\beta$ -H), 2.21 (t, 2H,  $J = 2.4$  Hz, 2 × CH), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 170.40$  (C=OCH<sub>3</sub>), 140.01 (C-3a), 139.48 (C-7a), 128.07, 126.97, 125.24 y 125.13 (CH<sub>arom</sub>), 81.21 (2 × C $\equiv$ CH), 77.04 (C-2), 71.74 (2 × C $\equiv$ CH), 68.94 (C-1), 39.99 (2 × CH<sub>2</sub>), 37.68 (C-3), 21.70 (CH<sub>3</sub>).

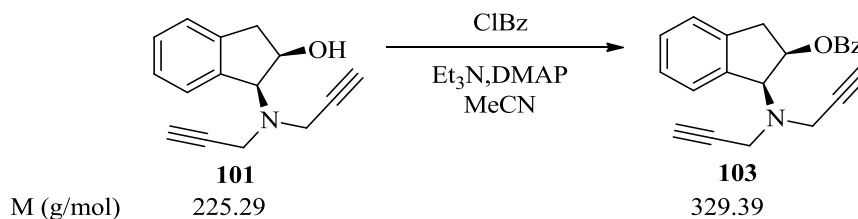
EM (FAB):  $m/z$  (%): 269 (6) [M+2]<sup>+</sup>, 268 (26) [M+1]<sup>+</sup>, 225 (2) [M<sup>+</sup>-acetilo], 197 (18), 169 (12), 154 (88), 137 (100).

Análisis calculado para C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub> (267.32): C 76.38, H 6.41, N 5.24; encontrado C 76.12, H 6.68, N 5.36.





#### 4.17. Benzoato de (1S,2R)-(-)-cis-1-(N,N-dipropargilamino)-2-indanilo (**103**).



Sobre una disolución de **101** (0.080 g, 0.36 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP en MeCN anhidro (5 mL), bajo atmósfera de argón y a 0°C, se añadió, gota a gota, Et<sub>3</sub>N (100 µL, 0.72 mmol) y cloruro de benzoilo (82 µL, 0.72 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación se eliminó el exceso de disolvente y se disolvió el crudo de reacción en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL), se lavó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 × 10 mL) y con una solución de NaCl saturada (3 × 10 mL). La fase orgánica resultante se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se rotó a vacío, obteniéndose un aceite amarillo que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (5 g), Hexano/AcOEt (6:1), obteniéndose **103** (0.073 g, Rdto. 73%) como un aceite amarillo.

**Compuesto 103:** Aceite amarillo.

$$[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = -85.6^\circ (25^\circ\text{C}, 0.25, \text{CHCl}_3).$$

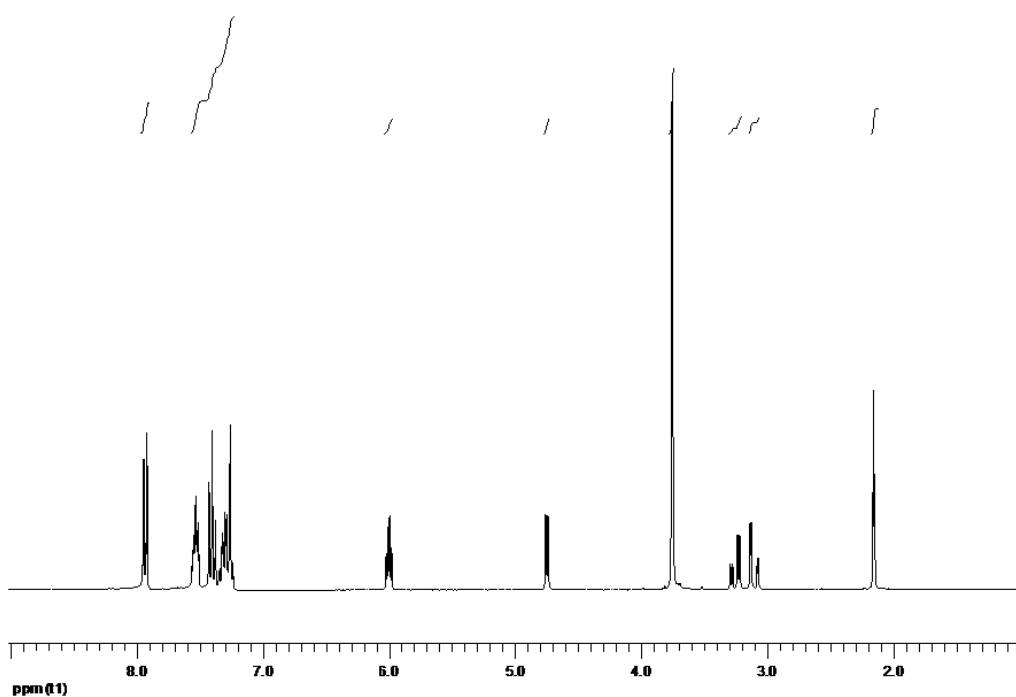
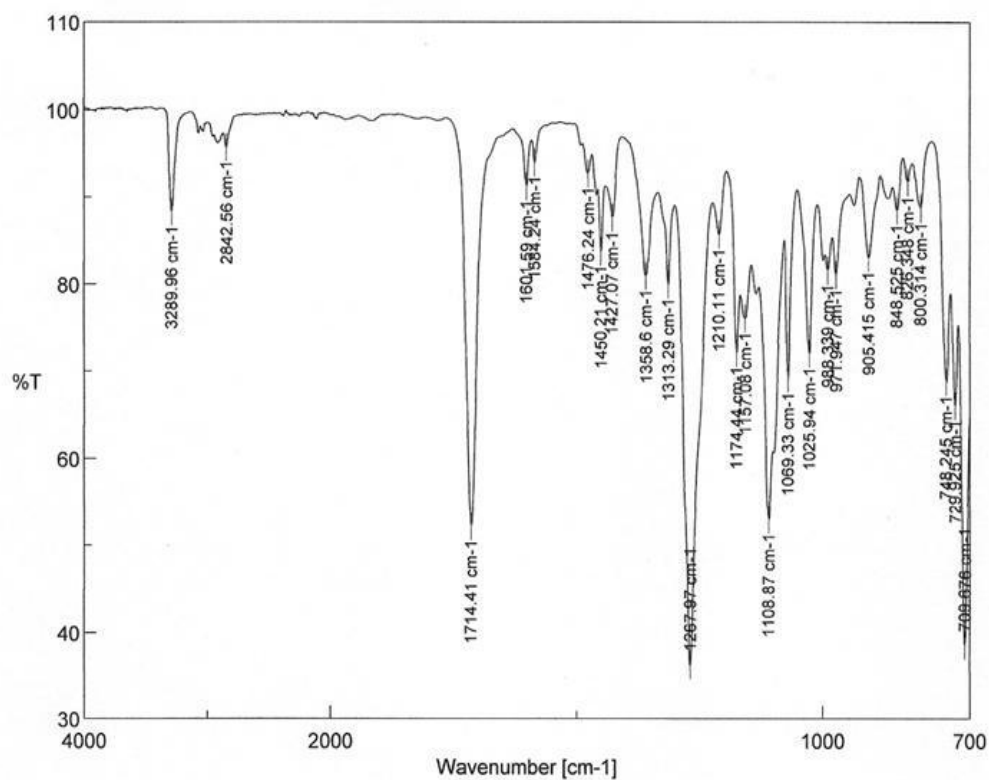
$$\text{IR } \nu = 3289, 2842, 1714, 1267, 1108, 1069 \text{ cm}^{-1}.$$

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.95-7.92 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.56-7.50 (m, 7H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 4 × H<sub>arom</sub>), 6.00 (dt, 1H,  $J$  = 5.6, 2.6 Hz, 2-H), 4.74 (d, 1H,  $J$  = 5.3 Hz, 1-H), 3.75 (d, 4H,  $J$  = 2.3 Hz, 2 × CH<sub>2</sub>), 3.29-3.06 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB}$  = 17.0 Hz,  $J_{AM}$  = 5.7 Hz,  $J_{BM}$  = 2.7 Hz, 3 $\alpha$ -H, 3 $\beta$ -H), 2.15 (t, 2H,  $J$  = 2.1 Hz, 2 × CH).

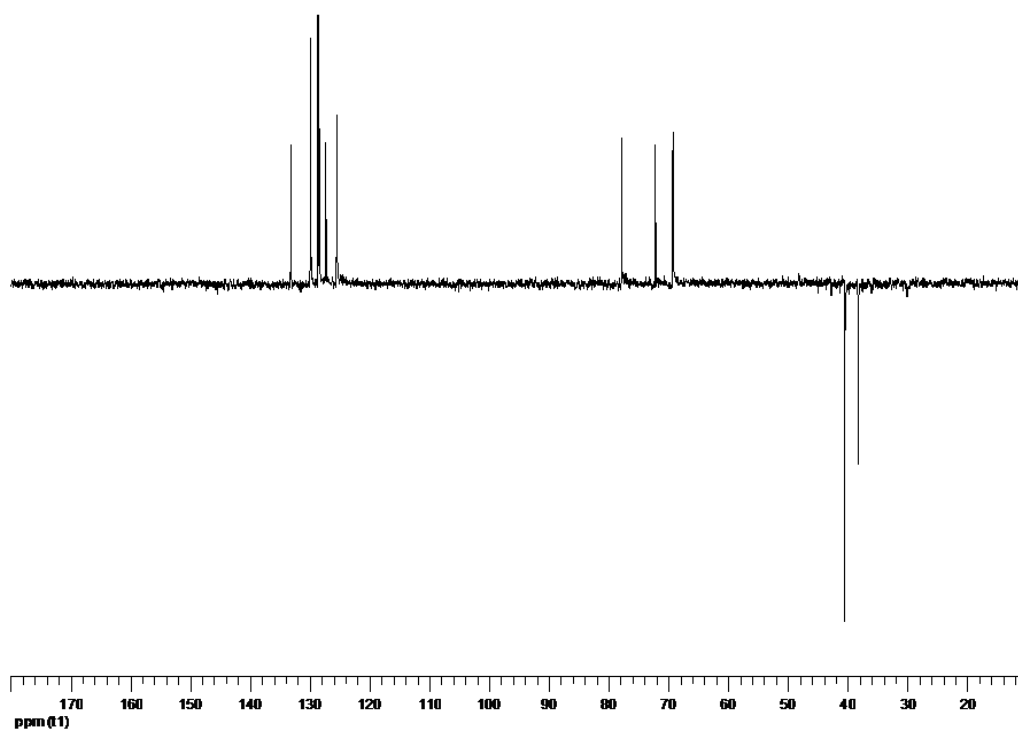
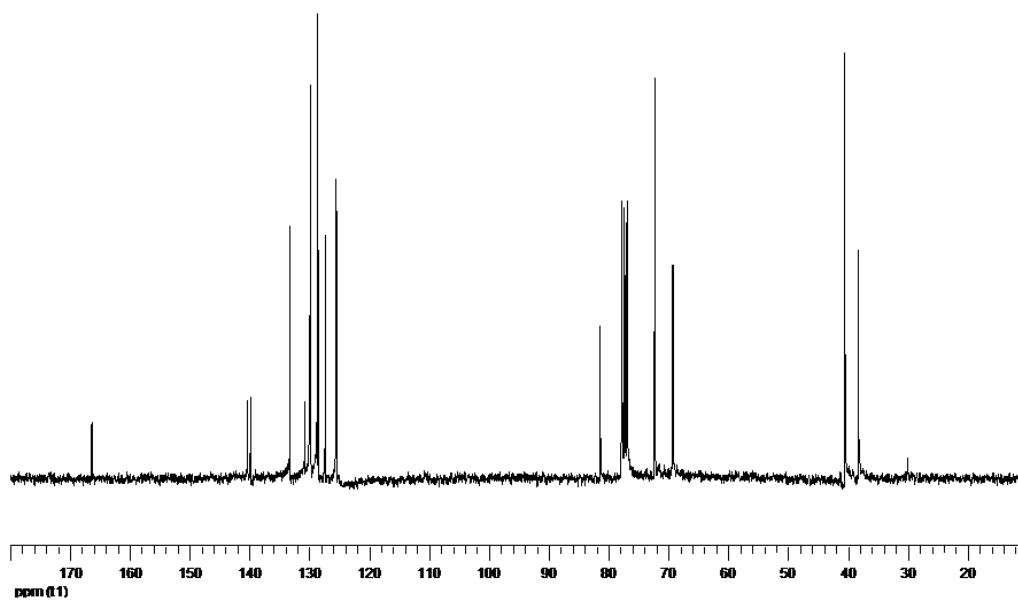
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 166.36 (CO), 140.30 (C-3a), 139.81 (C-7a), 133.16 (C'-4), 130.72 (C'-1), 129.83, 128.61, 128.39, 127.28, 125.49 y 125.43 (4 × CH<sub>arom</sub>, 4 × C'-H), 81.30 (2 × C $\equiv$ CH), 77.75 (C-2), 72.20 (2 × C $\equiv$ CH), 69.17 (C-1), 40.40 (2 × CH<sub>2</sub>), 38.13 (C-3).

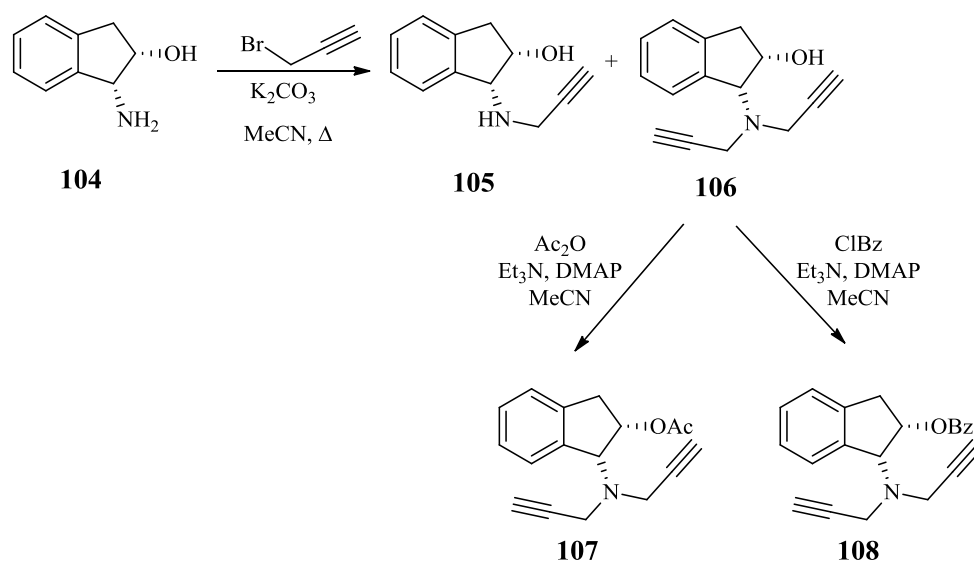
**EM (FAB): m/z (%):** 331 (11) [M+2]<sup>+</sup>, 330 (40) [M+1]<sup>+</sup>, 231 (68), 186 (3), 154 (95), 137 (100), 105 (25).

Análisis calculado para C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> (329.39): C 80.22, H 5.81, N 4.25; encontrado C 80.05, H 6.01, N 4.34.

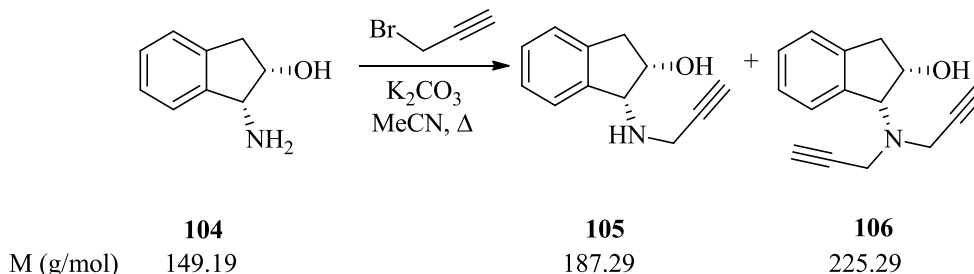








**4.18. (1*R*,2*S*)-(-)-cis-1-(*N*-Propargilamino)-2-indanol (105) y (1*R*,2*S*)-(-)-cis-1-(*N,N*-dipropargilamino)-2-indanol (106).**



Sobre una mezcla de **104** (1.00 g, 6.70 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.930 g, 6.70 mmol) en MeCN anhidro (20 mL), bajo atmósfera de argón y a 0°C, se adicionó bromuro de propargilo (1.5 mL, 13.40 mmol), gota a gota, y se reflujo durante 5 horas. A continuación se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío y se disolvió el residuo obtenido en AcOEt (20 mL) y se lavó con una solución de NaOH 2N (3 × 20 mL). La fase orgánica resultante se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminó el exceso de disolvente por rotación a vacío, aislándose un sólido blanco que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (60 g), Hexano/AcOEt (2:1), obteniéndose en primer lugar **106** (0.780 mg, Rdto. 52%) como un sólido beige y finalmente **105** (0.36 mg, Rdto. 29%) como un sólido blanco.

**Compuesto 105:** Sólido blanco, p.f. 105-107°C.

$[\alpha]_D^{26} = -38.6^\circ$  (26°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

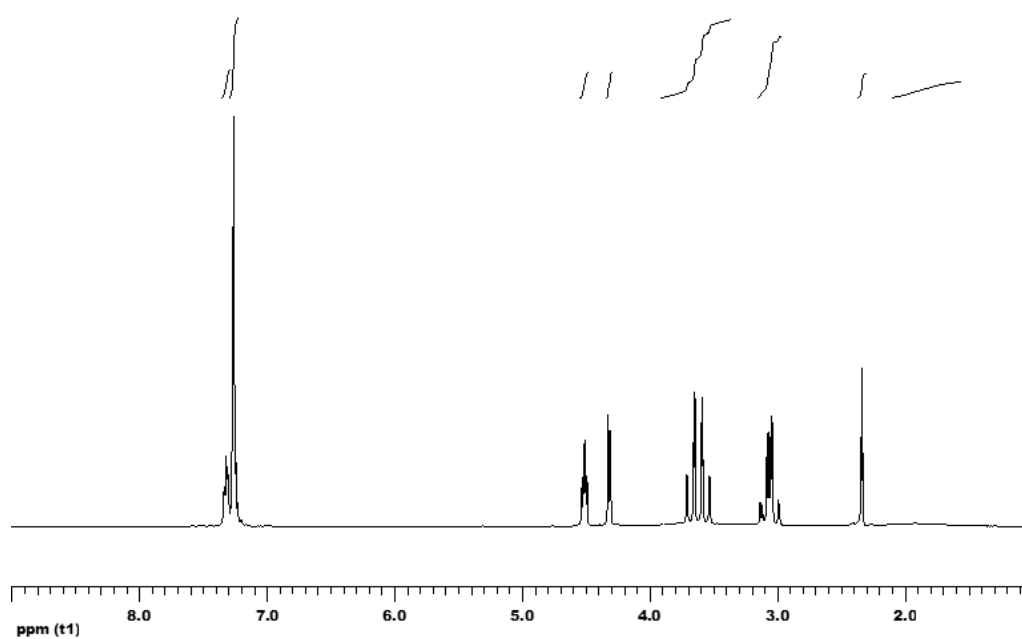
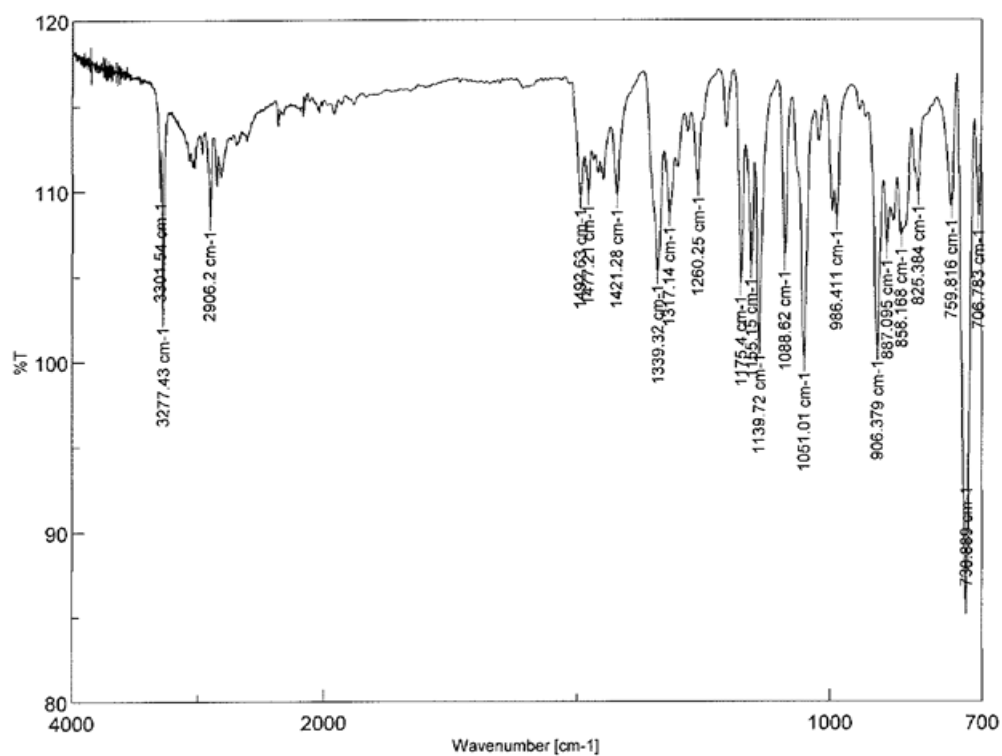
**IR ν** = 3277, 2906, 1421, 1339, 1139, 1051, 731 cm<sup>-1</sup>.

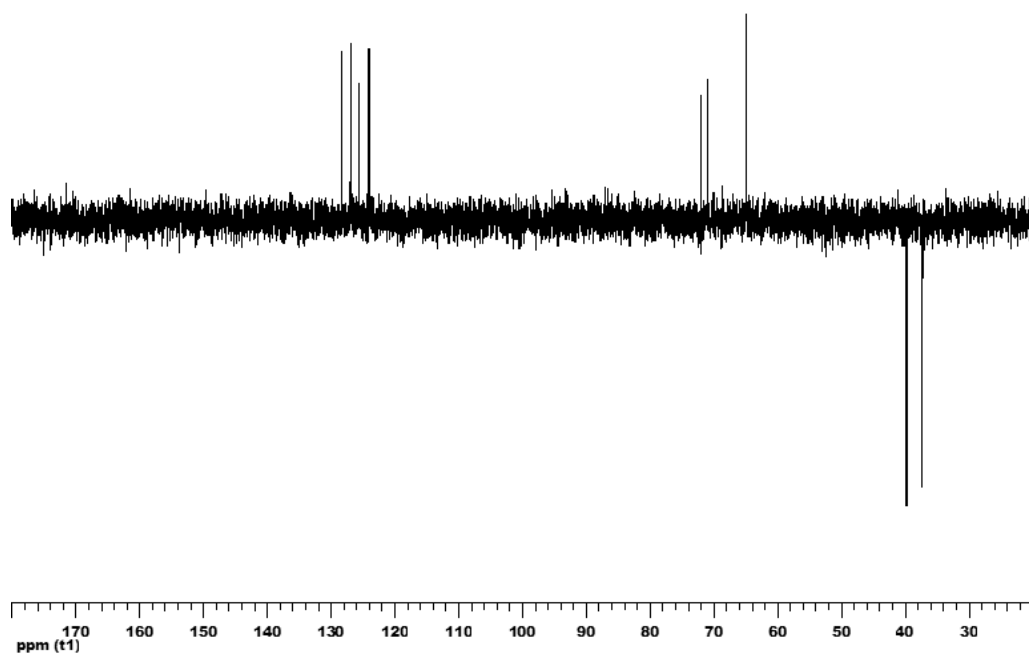
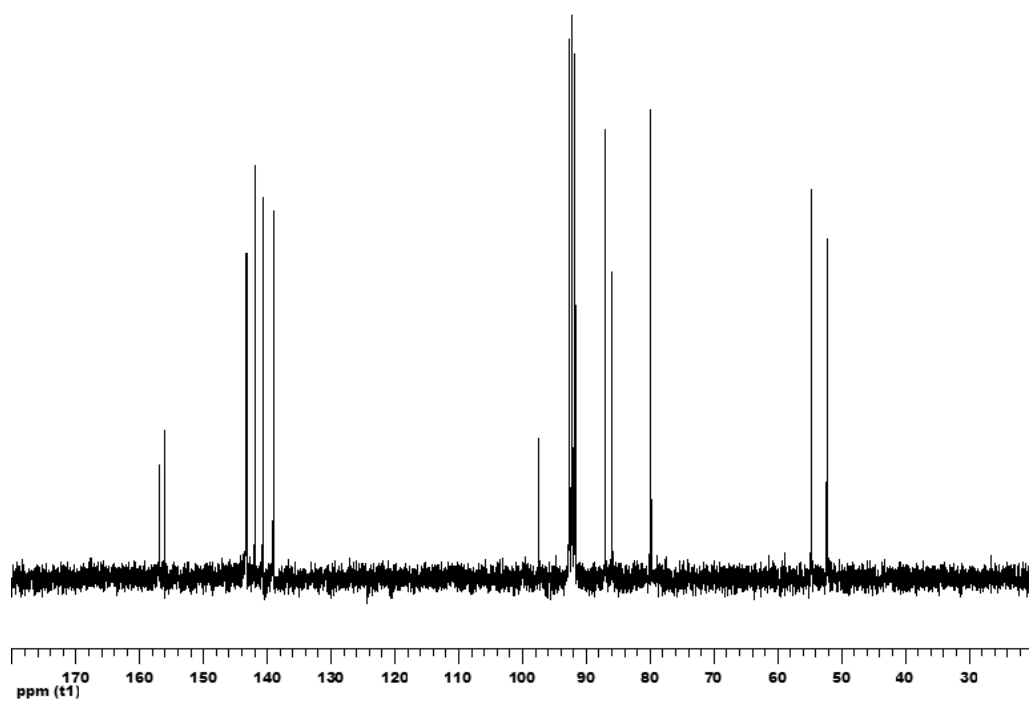
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ** = 7.32-7.30 (m, 1H, 7-H), 7.26-7.18 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 4.52-4.47 (m, 1H, 2-H), 4.31-4.29 (m, 1H, 1-H), 3.69-3.52 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, intercambia con D<sub>2</sub>O, OH), 3.11-2.97 (sistema AB, 1H, *J* = 16.5 Hz, 3α-H), 3.10-2.96 (sistema AB, 1H, *J* = 16.5 Hz, 3β-H), 2.32 (t, 1H, *J* = 2.5 Hz, CH), 1.89 (s.an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, NH).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ** = 141.84 (C-3a), 141.05 (C-7a), 128.18, 126.80, 125.58 y 123.95 (CH<sub>arom</sub>), 82.26 (C≡CH), 71.88 (C-2), 70.80 (C≡CH), 64.71 (C-1), 39.55 (CH<sub>2</sub>), 37.08 (C-3).

**EM (ESI): m/z (%):** 189 (2) [M+2]<sup>+</sup>, 188 (12) [M+1]<sup>+</sup>, 133 (100) [M<sup>+</sup>-propargilamino].

Análisis calculado para C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO (187.24): C 76.98, H 7.00, N 7.48; encontrado C 76.81, H 7.11, N 7.41.





**Compuesto 106:** Sólido beige, p.f. 105-107°C.

$[\alpha]_D^{26^\circ} = -62.6^\circ$  (26°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

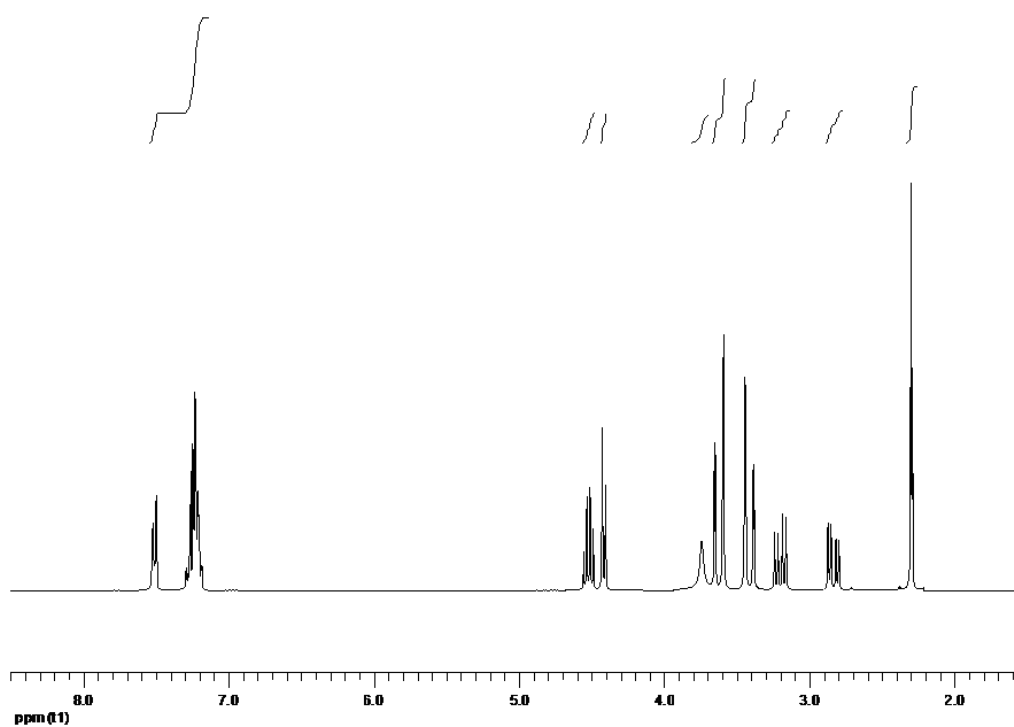
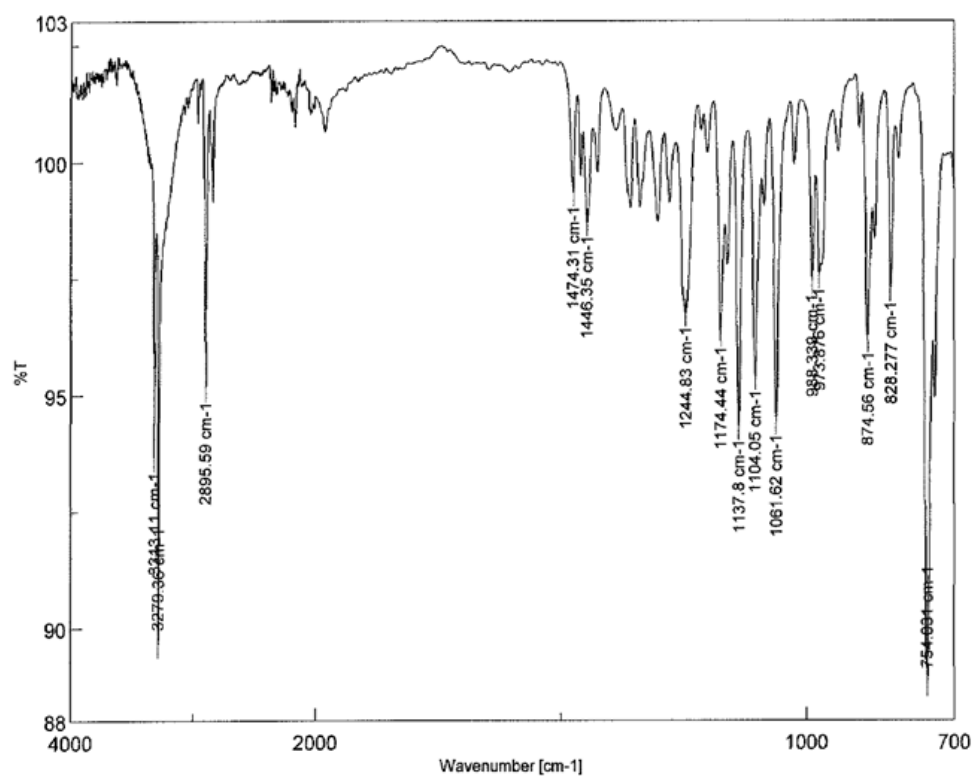
**IR**  $\nu$  = 3279, 2895, 1446, 1244, 1137, 1061, 754 cm<sup>-1</sup>.

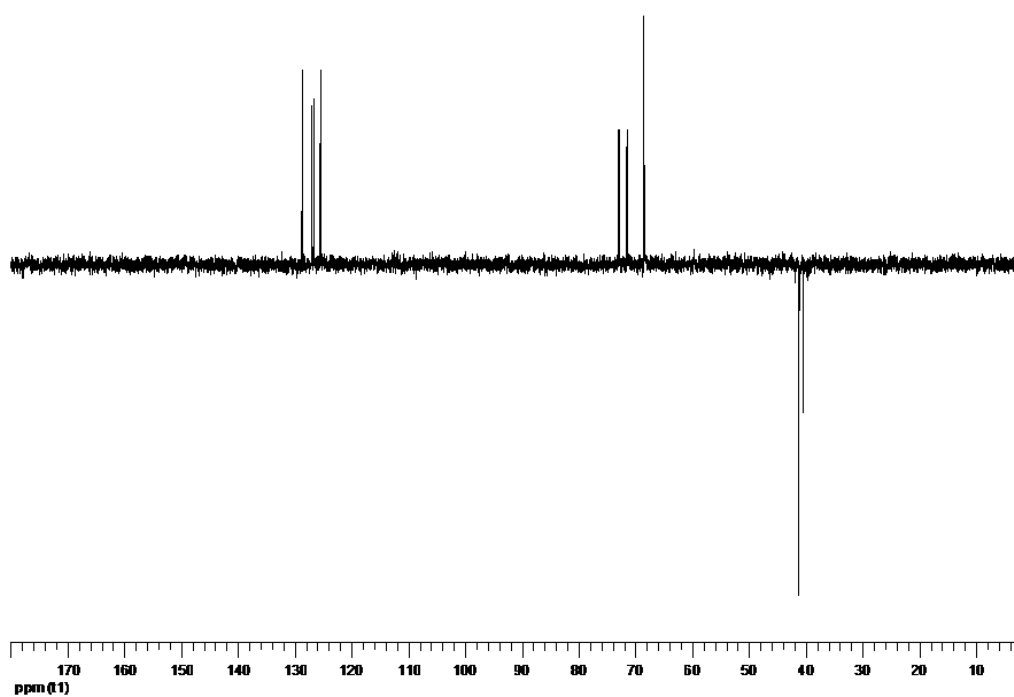
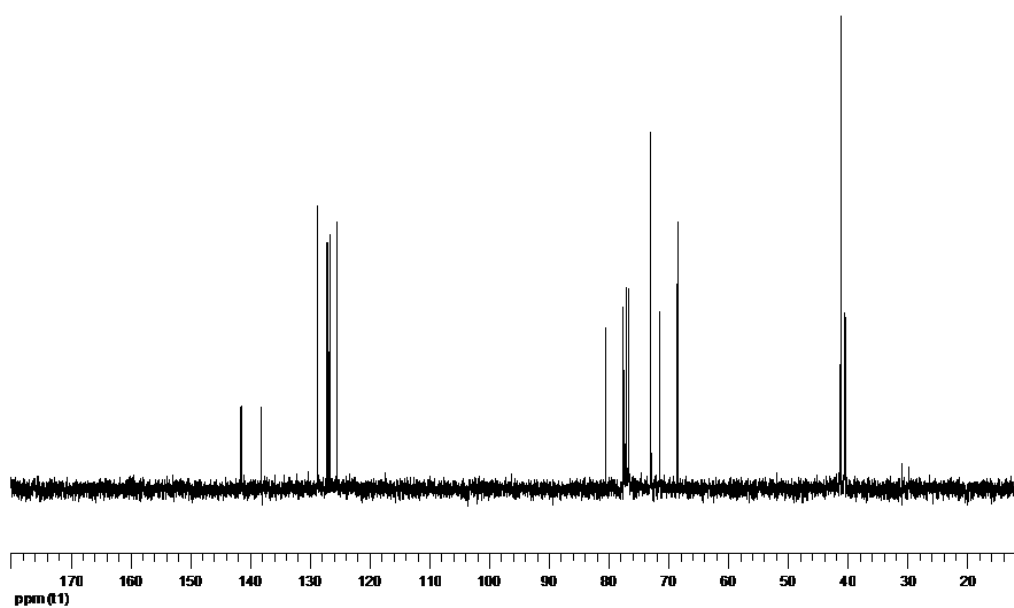
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.52-7.51 (m, 1H, 7-H), 7.50-7.19 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 4.52 (q, 1H,  $J$  = 6.8 Hz, 2-H), 4.42-4.40 (m, 1H, 1-H), 3.75 (s. an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, OH), 3.65-3.38 (sistema AB, 2H,  $J$  = 17.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.64-3.37 (sistema AB, 2H,  $J$  = 17.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.24-2.79 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB}$  = 16.5 Hz,  $J_{AM}$  = 7.2 Hz,  $J_{BM}$  = 6.1 Hz, 3 $\alpha$ -H, 3 $\beta$ -H), 2.29 (t, 2H,  $J$  = 2.3 Hz, 2  $\times$  CH).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 141.49 (C-3a), 138.18 (C-7a), 128.71, 127.06, 126.66 y 125.47 (CH<sub>arom</sub>), 80.40 (2  $\times$  C $\equiv$ CH), 72.89 (2  $\times$  C $\equiv$ CH), 71.42 (C-2), 68.39 (C-1), 41.06 (2  $\times$  CH<sub>2</sub>), 40.33 (C-3).

**EM (ESI): m/z (%):** 226 (4) [M+1]<sup>+</sup>, 133 (100) [M<sup>+</sup>-(2  $\times$  propargilamino)]<sup>+</sup>, 105 (25).

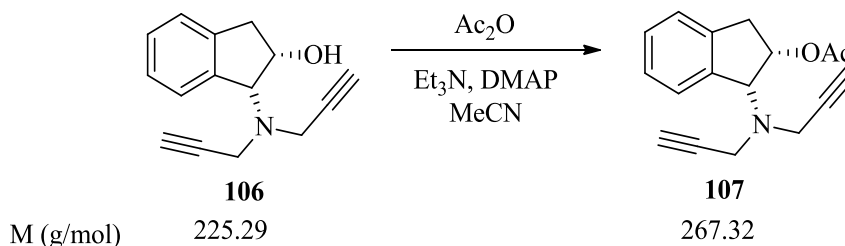
Análisis calculado para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO (225.29): C 79.97, H 6.71, N 6.22; encontrado C 79.83, H 6.86, N 6.35.







**4.19. Acetato de (1R,2S)-(+)-cis-1-(N,N-dipropargilamino)-2-indanilo (107).**



Sobre una disolución de **106** (0.08 g, 0.36 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP en MeCN anhidro (5 mL), bajo atmósfera de argón y a 0°C, se adicionó, gota a gota, Et<sub>3</sub>N (100 µL, 0.72 mmol) y ácido acético (69 µL, 0.72 mmol). La mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y, a continuación, se evaporó el exceso de disolvente y el residuo obtenido se disolvió en AcOEt (10 mL) y se extrajo con H<sub>2</sub>O (3 × 10 mL) y posteriormente con una solución saturada de NaCl (3 × 10 mL). La fase orgánica resultante se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminó el exceso de disolvente a vacío, obteniéndose un aceite transparente que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (5 g), Hexano/AcOEt (5:1), aisándose **107** (0.081 g, Rdto. 84%) como un sólido blanco.

**Compuesto 107:** Sólido blanco, p.f. 50-52°C.

$[\alpha]_D^{24^\circ\text{C}} = +74.4^\circ$  (24°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

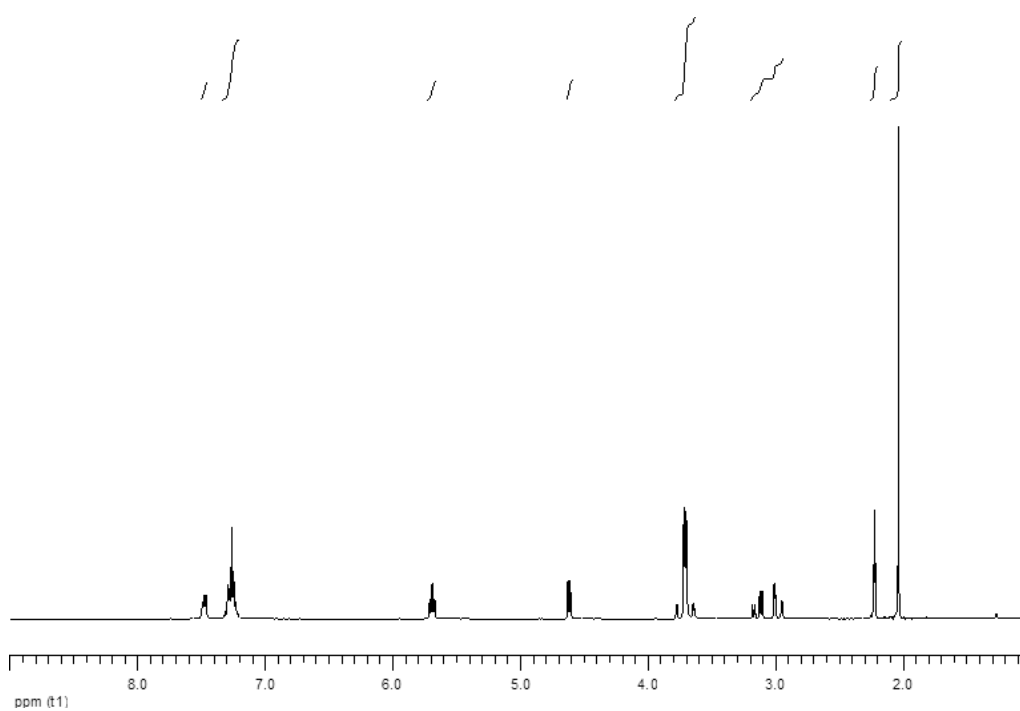
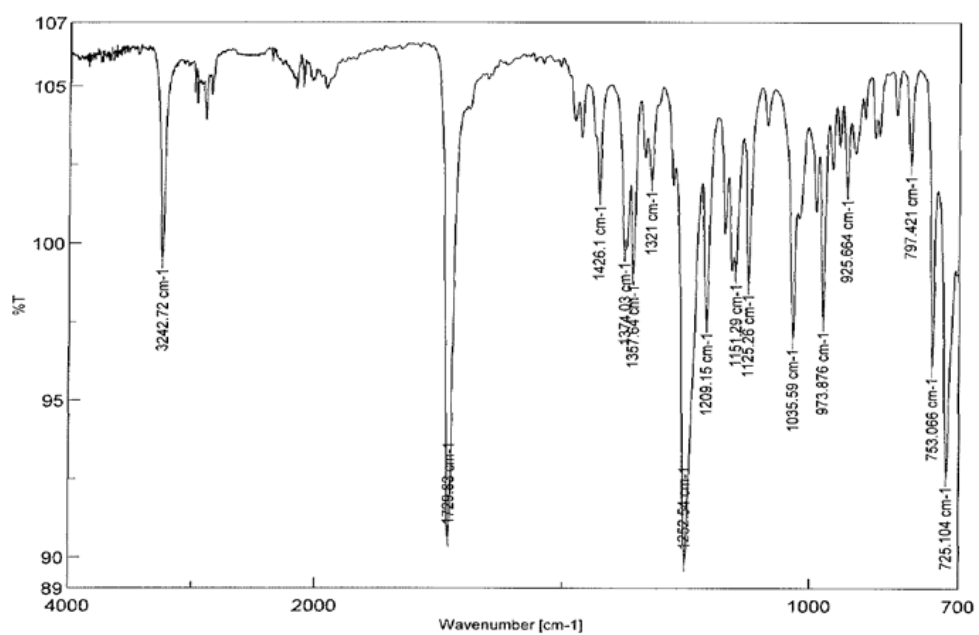
IR  $\nu = 3242, 1729, 1252, 1035 \text{ cm}^{-1}$ .

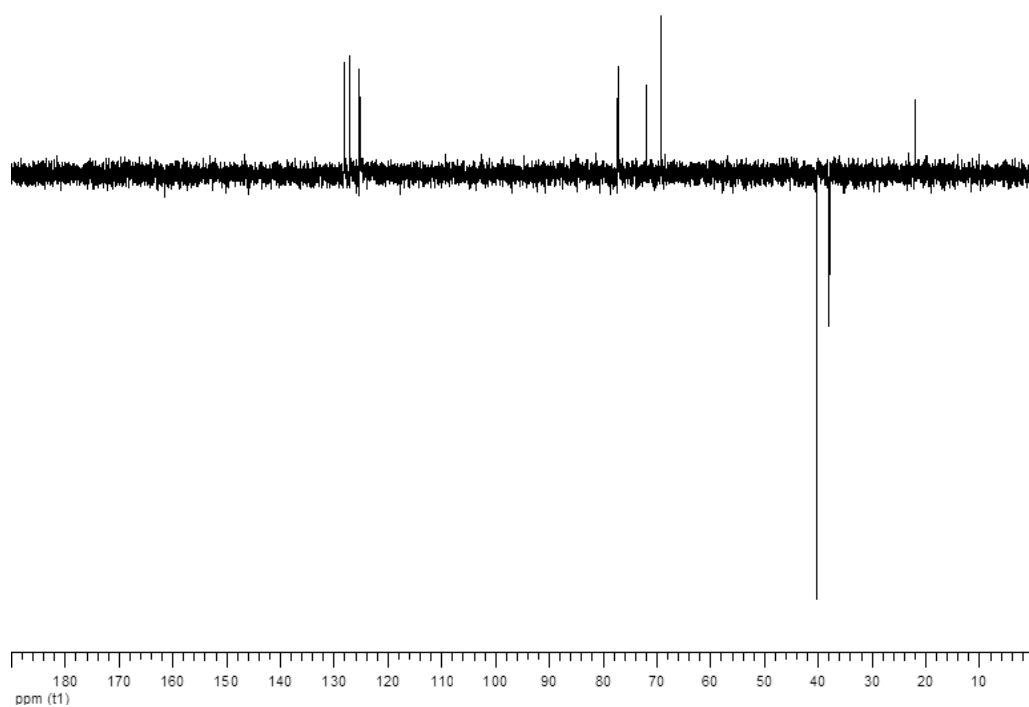
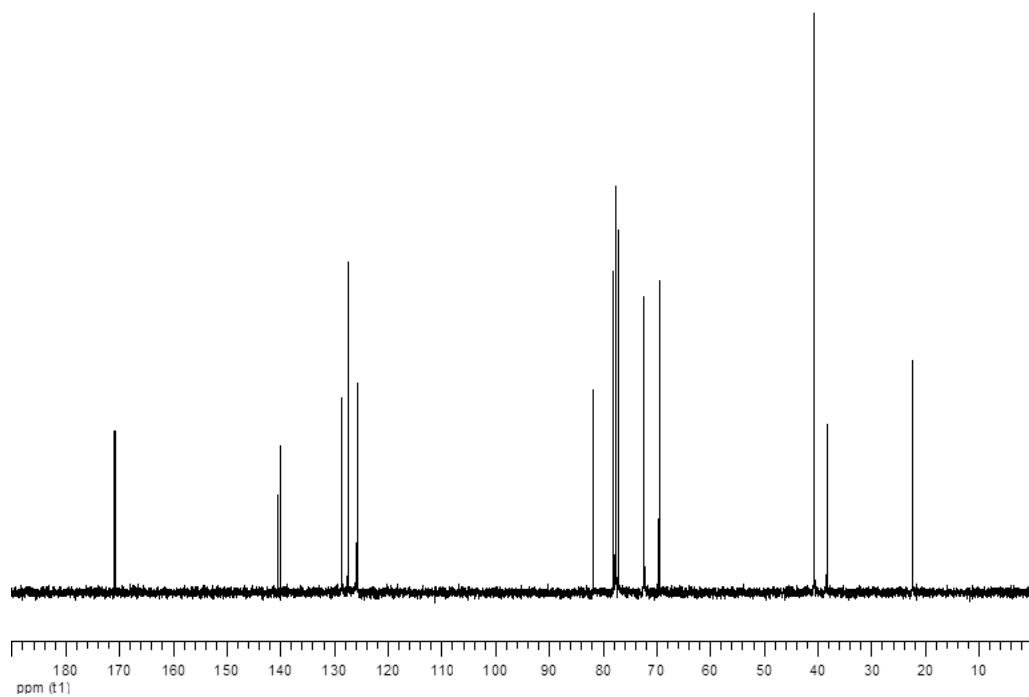
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta = 7.49\text{-}7.46$  (m, 1H, 7-H),  $7.32\text{-}7.21$  (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H),  $5.72\text{-}5.66$  (m, 1H, 2-H),  $4.62\text{-}4.60$  (m, 1H, 1-H),  $3.77\text{-}3.64$  (sistema AB, 2H,  $J = 17.2 \text{ Hz}$ , CH<sub>2</sub>),  $3.76\text{-}3.63$  (sistema AB, 2H,  $J = 17.2 \text{ Hz}$ , CH<sub>2</sub>),  $3.17\text{-}2.93$  (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB} = 17.1 \text{ Hz}$ ,  $J_{AM} = 5.6 \text{ Hz}$ ,  $J_{BM} = 2.5 \text{ Hz}$ , 3 $\alpha$ -H, 3 $\beta$ -H),  $2.22$  (t, 2H,  $J = 2.3 \text{ Hz}$ , 2 × CH),  $2.03$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta = 170.42$  (C=OCH<sub>3</sub>),  $140.03$  (C-3a),  $139.50$  (C-7a),  $128.08$ ,  $126.98$ ,  $125.26$  y  $125.15$  (CH<sub>arom</sub>),  $81.22$  (2 × C $\equiv$ CH),  $77.03$  (C-2),  $71.75$  (2 × C $\equiv$ CH),  $68.96$  (C-1),  $39.99$  (2 × CH<sub>2</sub>),  $37.69$  (C-3),  $21.70$  (CH<sub>3</sub>).

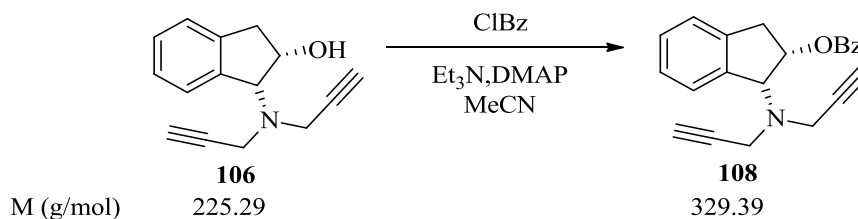
**EM (ESI): m/z (%):** 269 (10) [M+2]<sup>+</sup>, 268 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 175 (67) [M<sup>+</sup>-(2 × propargilamino)].

Análisis calculado para C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub> (267.32): C 76.38, H 6.41, N 5.24; encontrado C 76.21, H 6.52, N 5.41.





#### 4.20. Benzoato de (1R,2S)-(+)-cis-1-(N,N-dipropargilamino)-2-indanilo (108).



Sobre una disolución de **106** (0.080 g, 0.36 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP en MeCN anhidro (5 mL), bajo atmósfera de argón y a 0°C, se añadió Et<sub>3</sub>N (100 µL, 0.73 mmol) y cloruro de benzoilo (82 µL, 0.72 mmol), gota a gota. A continuación se agitó a temperatura ambiente durante 26 horas, finalizadas las cuales se eliminó el exceso de disolvente y se disolvió el residuo obtenido en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) y se lavó, sucesivamente, con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 × 10 mL) y con una solución de NaCl saturada (3 × 10 mL). La fase orgánica resultante se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se rotó a vacío, obteniéndose un aceite amarillo que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (6 g), Hexano/AcOEt /CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30:1:1), obteniéndose **108** (0.071 g, Rdto. 60%) como un aceite amarillo.

**Compuesto 108:** Aceite amarillo.

$[\alpha]_D^{24^\circ\text{C}} = +68.8^\circ$  (24°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

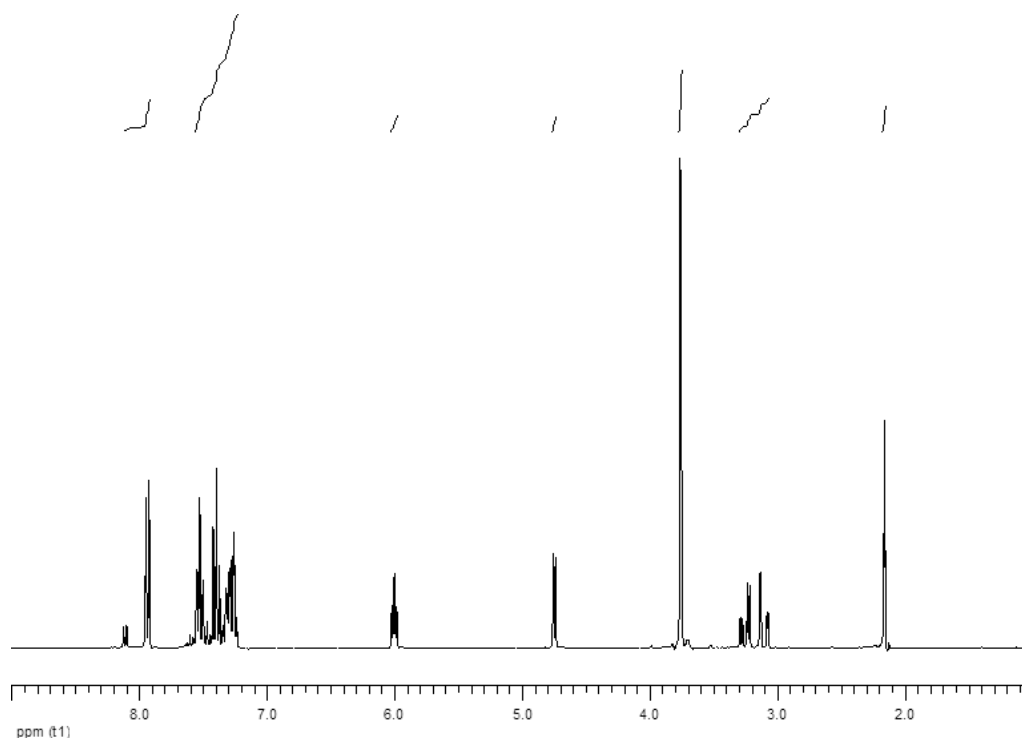
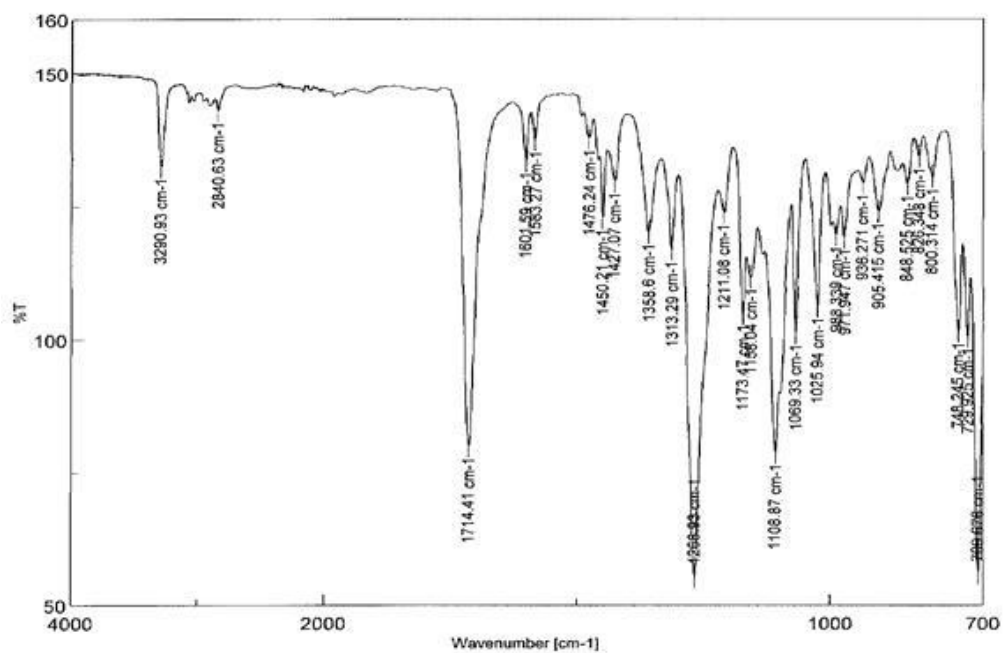
**IR**  $\nu = 3290, 1714, 1268, 1108, 1069 \text{ cm}^{-1}$ .

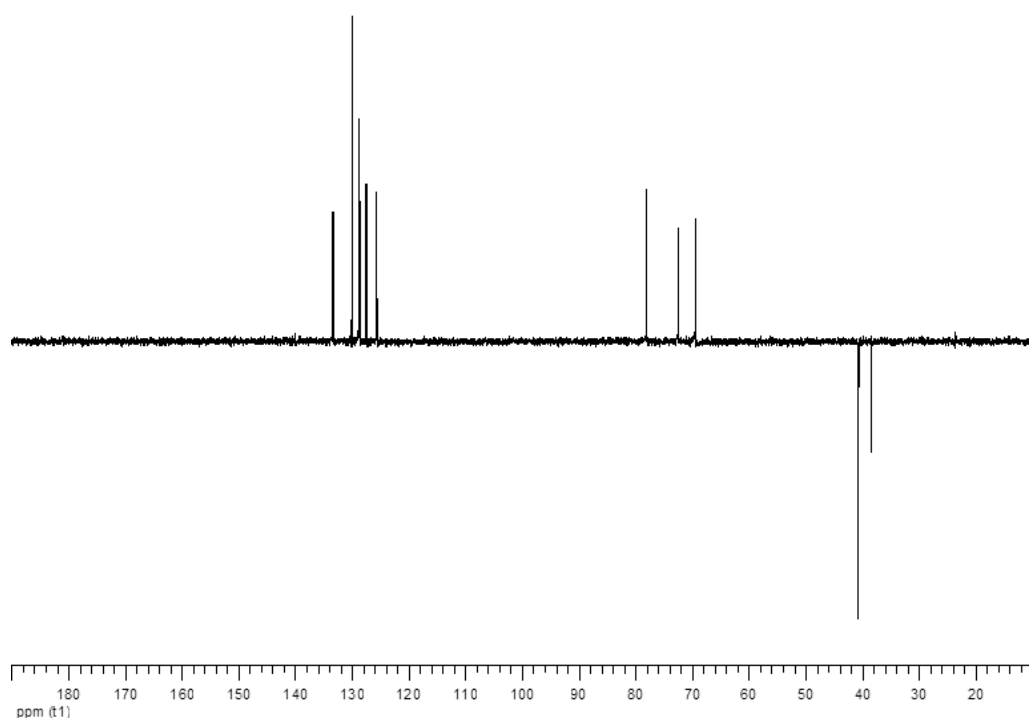
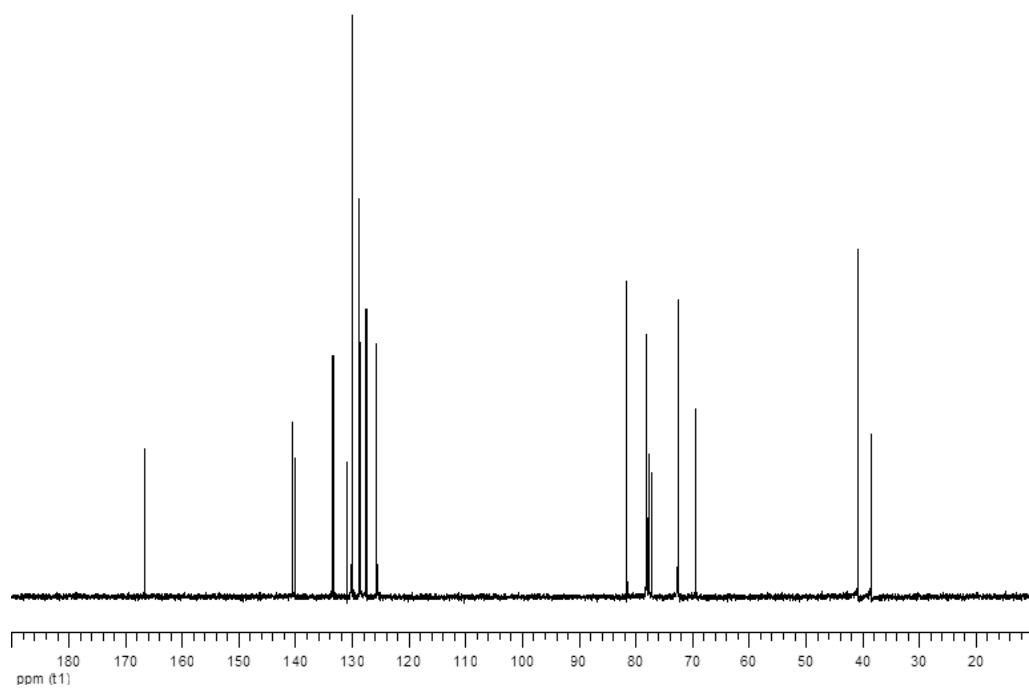
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta = 8.12\text{-}7.91$  (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.60-7.22 (m, 7H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 4 × H<sub>arom</sub>), 5.99 (dt, 1H,  $J = 5.5, 2.8$  Hz, 2-H), 4.73 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz, 1-H), 3.77-3.69 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>), 3.28-3.06 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB} = 17.1$  Hz,  $J_{AM} = 5.5$  Hz,  $J_{BM} = 2.7$  Hz, 3α-H, 3β-H), 2.15 (t, 2H,  $J = 2.2$  Hz, 2 × CH).

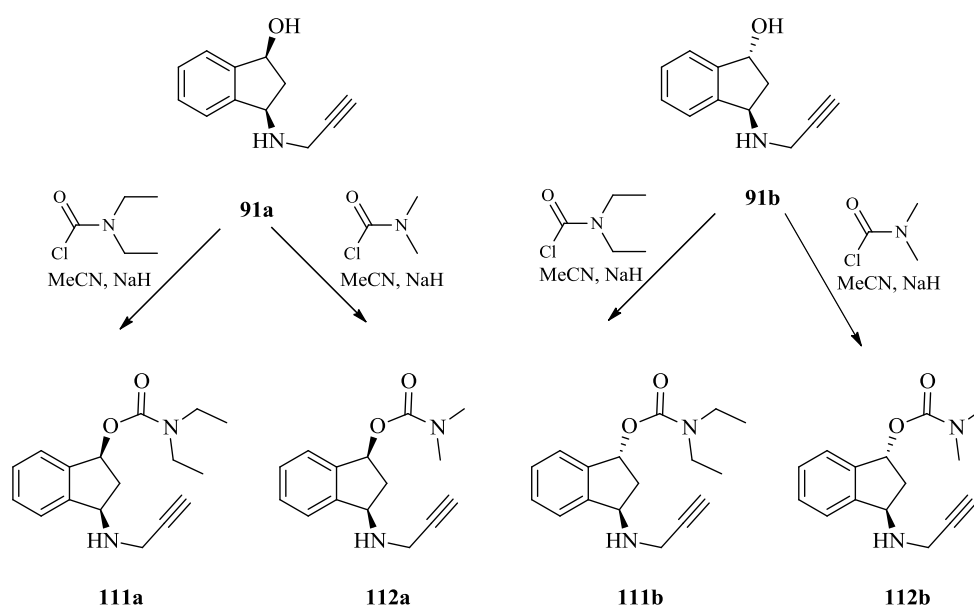
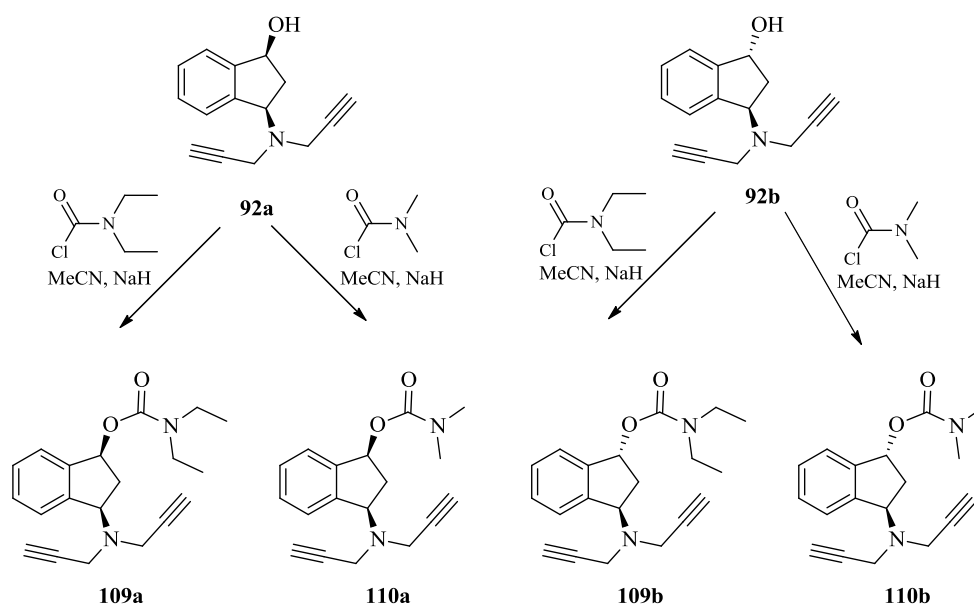
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta = 166.15$  (CO), 140.05 (C-3a), 139.59 (C-7a), 133.62 (C'-4), 130.48 (C'-1), 129.61, 128.45, 128.37, 127.06, 125.26 y 125.18 (4 × CH<sub>arom</sub>, 4 × C'-H), 81.06 (2 × C≡CH), 77.53 (C-2), 72.02 (2 × C≡CH), 68.91 (C-1), 40.18 (2 × CH<sub>2</sub>), 37.89 (C-3).

**EM (ESI): m/z (%):** 331 (15) [M+2]<sup>+</sup>, 330 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 237 (14) [M<sup>+</sup>-(2 × propargilamino)].

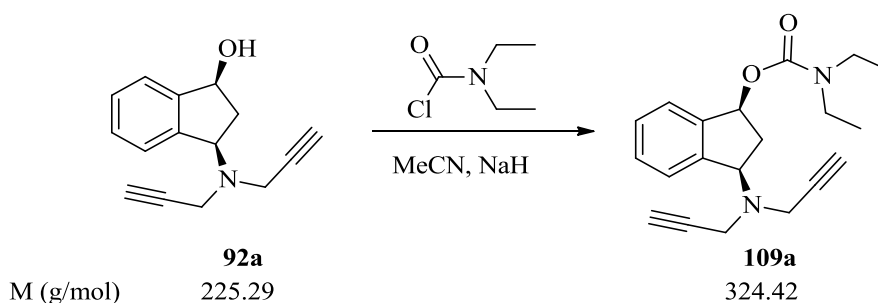
Análisis calculado para C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> (329.39): C 80.22, H 5.81, N 4.25; encontrado C 80.12, H 5.99, N 4.27.







**4.21. Dietilcarbamato de (±)-cis-3-(N,N-dipropargilamino)-1-indanilo (109a).**



Sobre una disolución de **92a** (80 mg; 0.56 mmol) en MeCN anhidro (4 mL) se adicionó cloruro de dietilcarbamoilo (80  $\mu\text{L}$ ; 0.60 mmol), bajo atmósfera de argón y a 0°C, seguido de la adición de NaH, dispersión al 60% en aceite mineral, (19 mg; 0.47 mmol), en pequeñas porciones. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 horas, finalizadas las cuales se eliminó el exceso de disolvente por evaporación a vacío y se disolvió el residuo obtenido en H<sub>2</sub>O (4 mL). La fase acuosa se extrajo con éter (3 x 6 mL) y la fase orgánica resultante se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminó el exceso de disolvente mediante evaporación a vacío, aislándose un aceite transparente que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice (8 g), Hexano/AcOEt (7:1), obteniéndose **109a** (60 mg; 51%), como un aceite transparente.

**Compuesto 109a:** Aceite transparente.

**IR  $\nu$**  = 3290, 2973, 1687, 1423, 1268, 1168  $\text{cm}^{-1}$ .

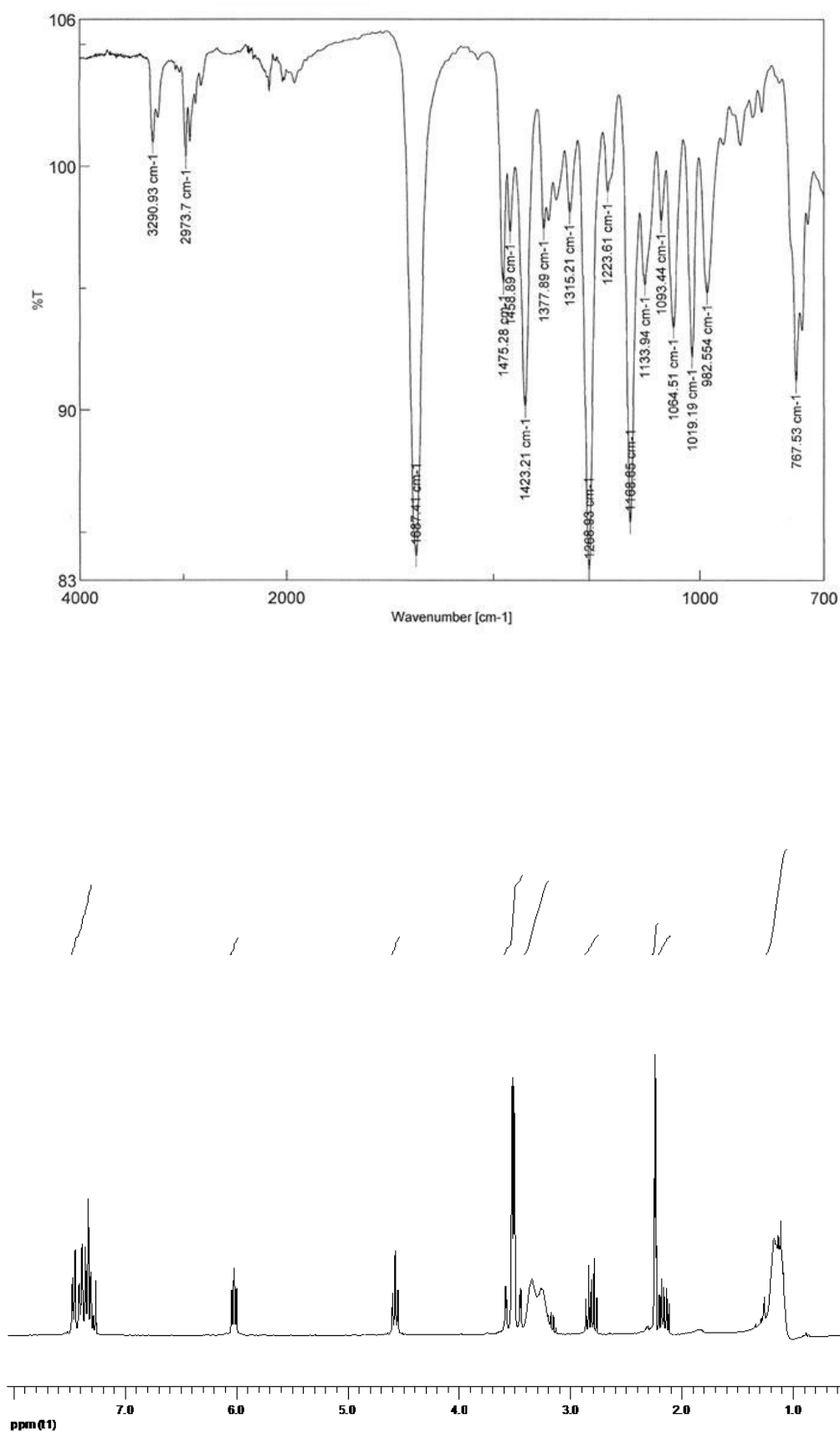
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$**  = 7.46-7.27 (m, 4H, H<sub>arom</sub>), 6.01 (t, 1H,  $J$  = 6.6 Hz, 1-H), 4.56 (t, 1H,  $J$  = 7.2 Hz, 3-H), 3.57-3.44 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.56-3.43 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.23-3.18 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.79 (dt, 1H,  $J$  = 15.1, 7.4 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.22 (t, 2H,  $J$  = 2.5 Hz, 2 x CH), 2.18-2.09 (m, 1H, 2 $\beta$ -H), 1.15-1.09 (m, 6H, 2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

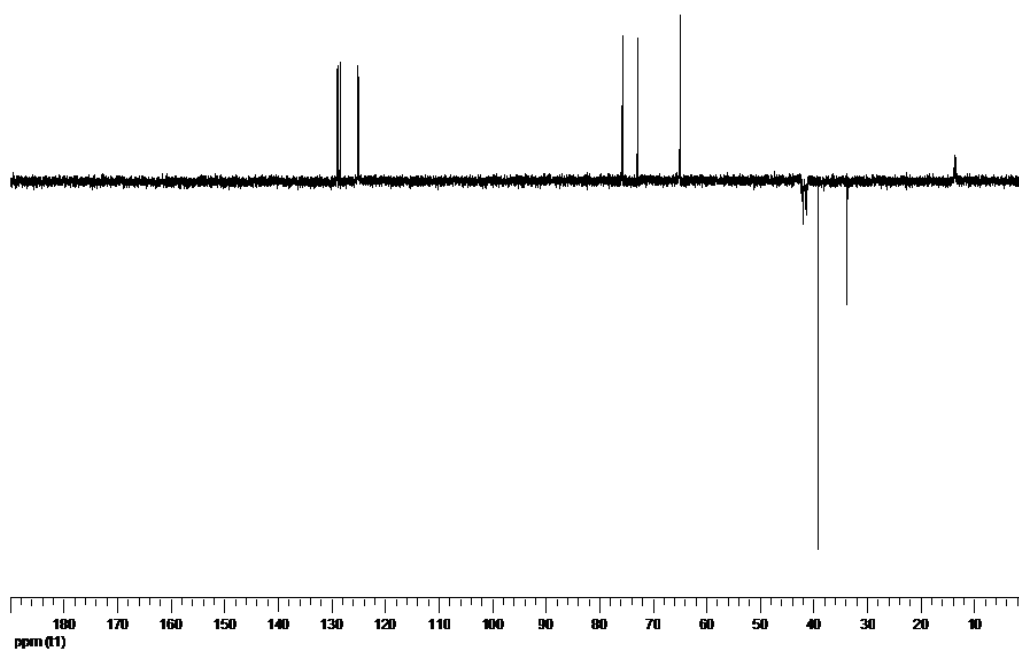
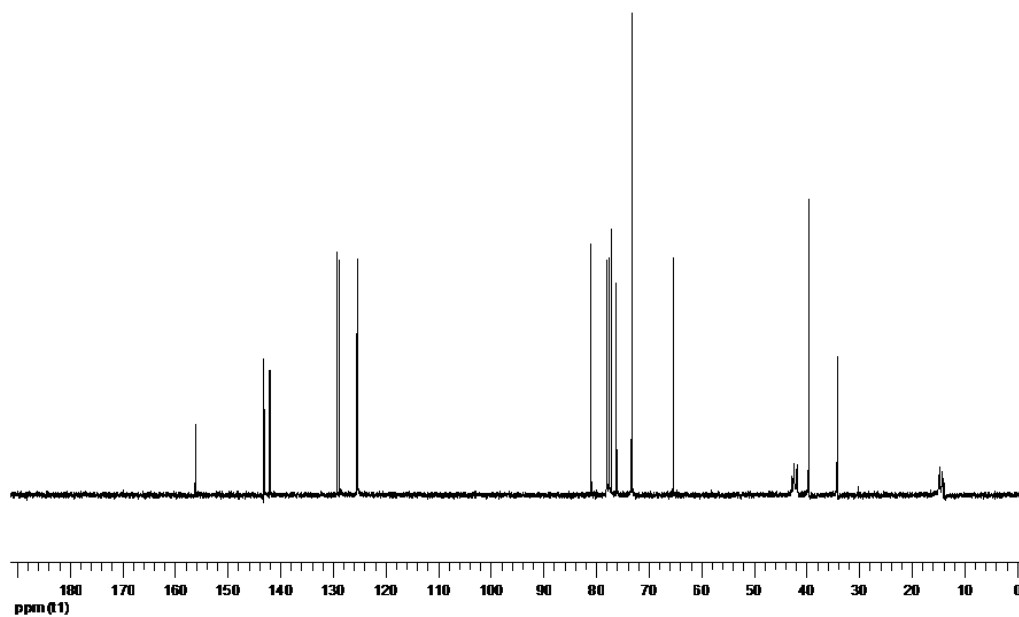
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$**  = 156.16 (CO), 143.02 (C-7a), 141.96 (C-3a), 129.24, 128.72, 125.40 y 125.30 (CH<sub>arom</sub>), 80.83 (2 x C $\equiv$ CH), 75.99 (2 x C $\equiv$ CH), 73.13 (C-1), 65.19 (C-3), 42.26 y 41.65 (2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 39.44 (2 x CH<sub>2</sub>), 34.00 (C-2), 14.54 y 13.99 (2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

**EM (FAB): m/z (%)**: 325 (73) [M+1]<sup>+</sup>, 324 (4) [M]<sup>+</sup>, 323 (10) [M-1]<sup>+</sup>, 288 (27), 208 (100) [(M-1)<sup>+</sup>-carbamato], 154 (17), 137 (24), 115 (91).

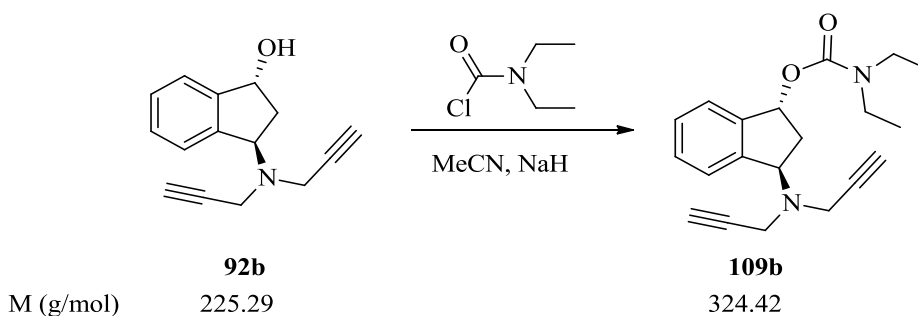
Análisis calculado para C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (324.42): C 74.04, H 7.46, N 8.64; encontrado C 73.86, H 7.71, N 8.69.







#### 4.22. Dietilcarbamato de (±)-*trans*-3-(*N,N*-dipropargilamino)-1-indanilo (**109b**).



Empleando la misma metodología descrita para el compuesto **109a** (véase apartado 4.21) se preparó el compuesto **109b** por reacción con cloruro de dietilcarbamoilo y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, obteniéndose **109b** (Rdto. 74%) como un sólido blanco.

**Compuesto 109b:** Sólido blanco, p.f. 74-76°C.

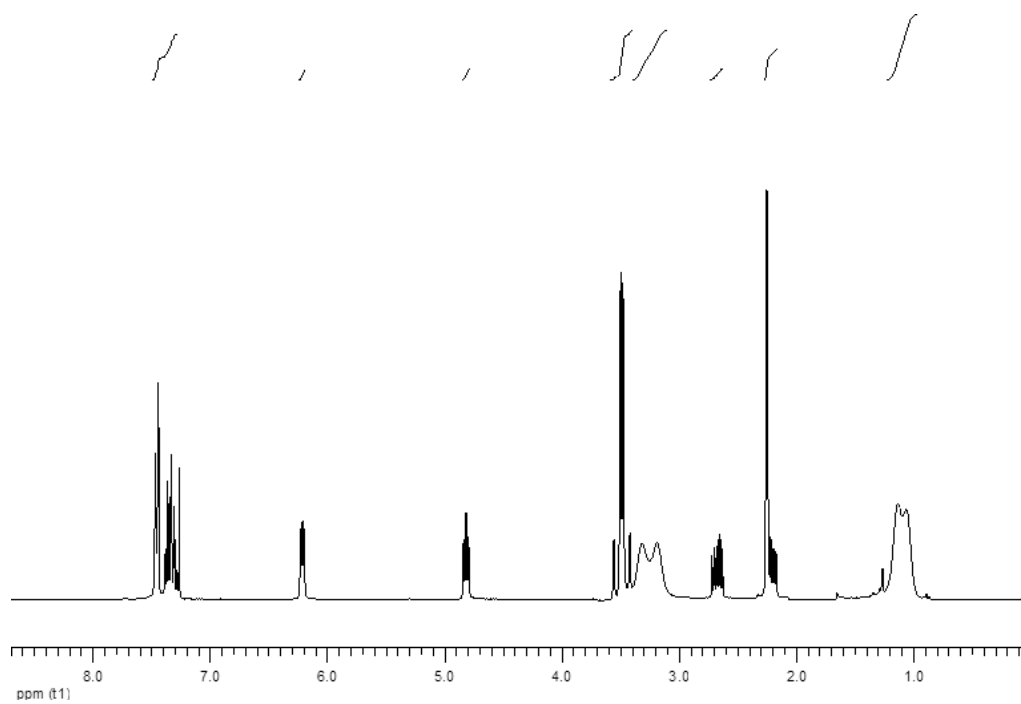
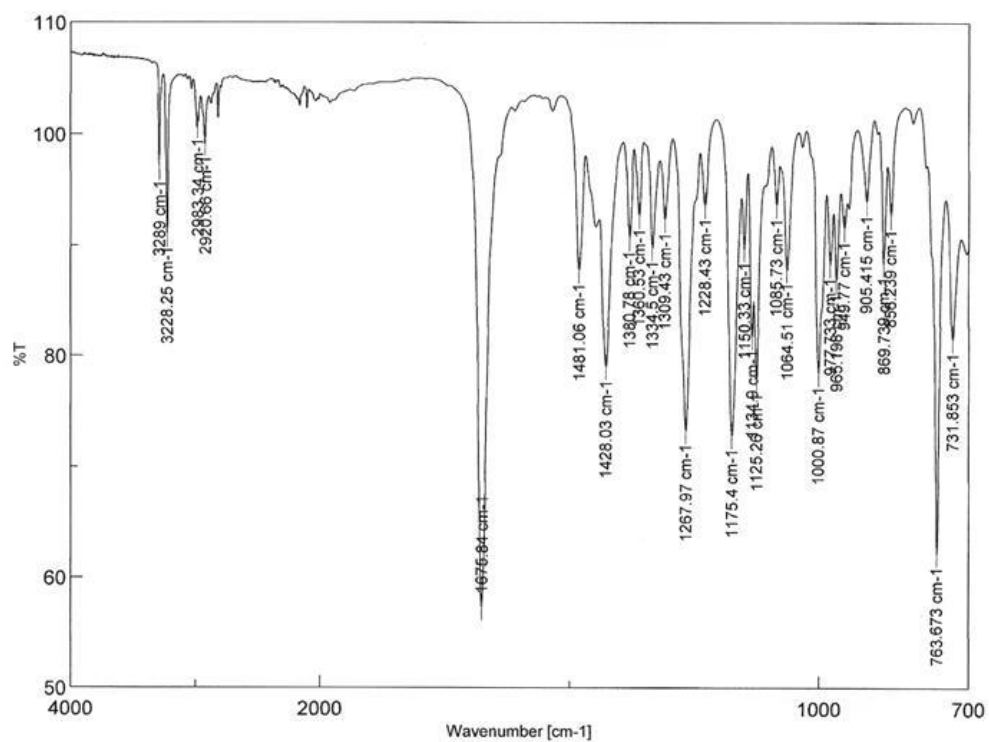
**IR**  $\nu$  = 3289, 3228, 2983, 1675, 1428, 1267, 1175  $\text{cm}^{-1}$ .

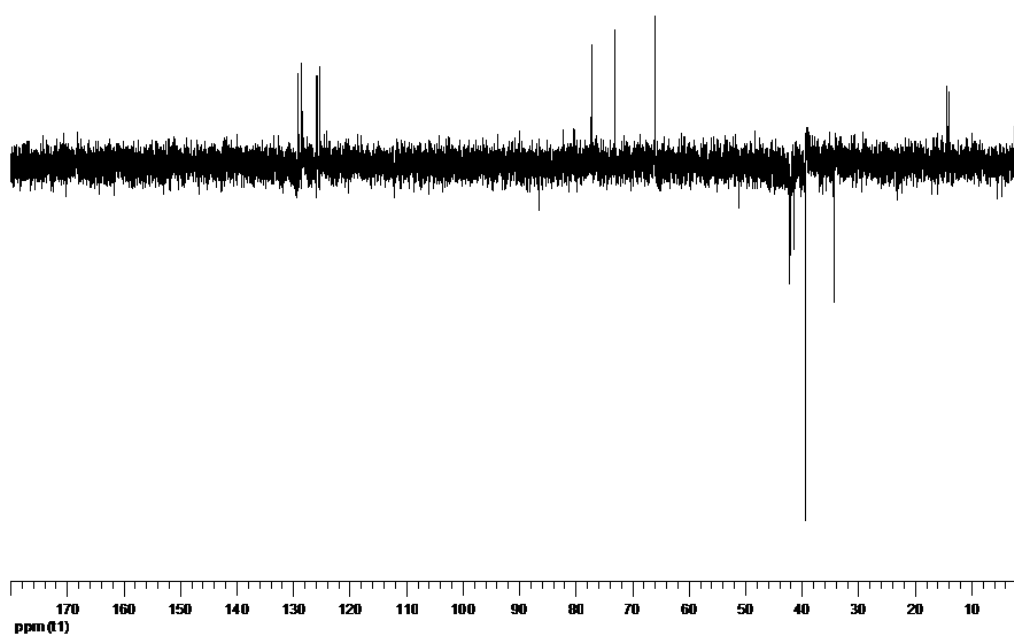
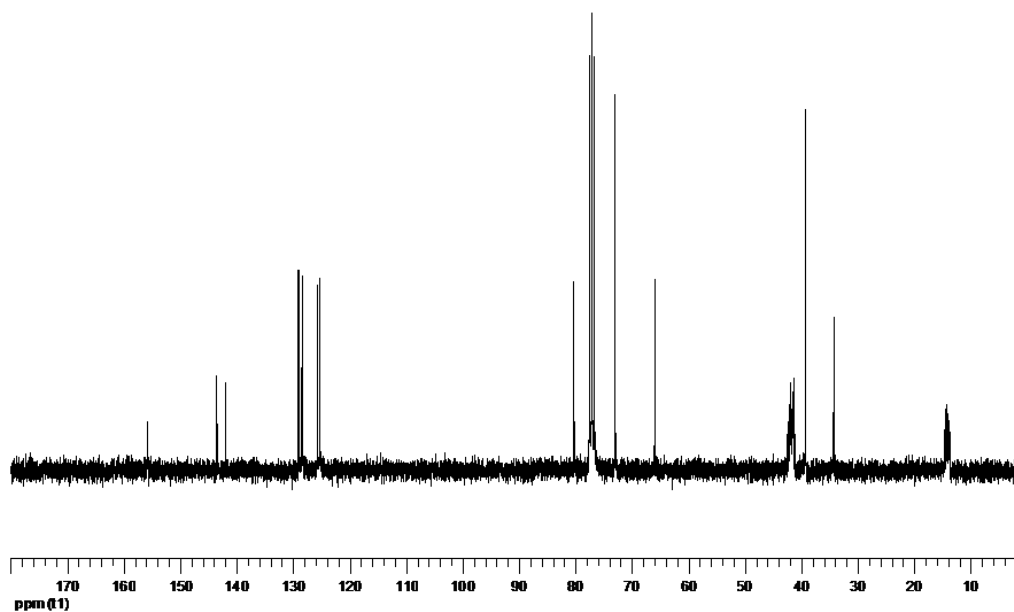
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 7.46-7.26 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.21 (dd, 1H,  $J$  = 6.9, 3.6 Hz, 1-H), 4.81 (t, 1H,  $J$  = 6.4 Hz, 3-H), 3.55-3.42 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.8 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.54-3.41 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.7 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.31-3.17 (m, 4H, 2 x  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 2.66 (ddd, 1H,  $J$  = 14.5, 6.9, 5.5 Hz,  $2\alpha\text{-H}$ ), 2.24 (t, 2H,  $J$  = 2.3 Hz, 2 x CH), 2.22-2.16 (m, 1H,  $2\beta\text{-H}$ ), 1.12-1.05 (m, 6H, 2 x  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 155.88 (CO), 143.49 (C-7a), 141.95 (C-3a), 129.03, 128.40, 125.73 y 125.28 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 80.17 (2 x  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 77.07 (2 x  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 72.86 (C-1), 65.85 (C-3), 41.74 y 41.25 (2 x  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 39.11 (2 x  $\text{CH}_2$ ), 34.11 (C-2), 14.10 y 13.78 (2 x  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ).

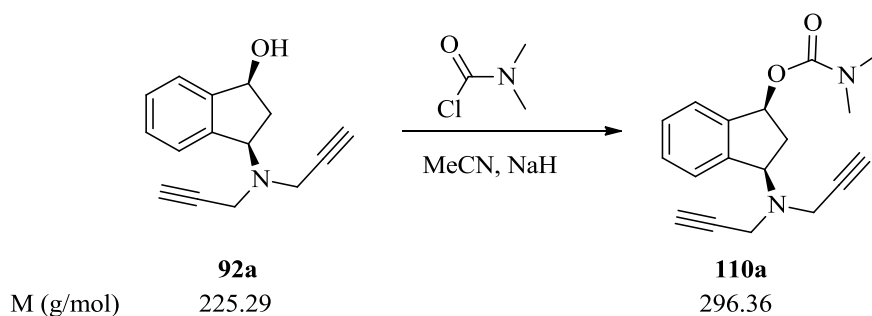
**EM (FAB): m/z (%):** 326 (3)  $[\text{M}+2]^+$ , 325 (28)  $[\text{M}+1]^+$ , 278 (24), 231 (61), 154 (90), 137 (100).

Análisis calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$  (324.42): C 74.04, H 7.46, N 8.64; encontrado C 73.82, H 7.65, N 8.82.





**4.23. Dimetilcarbamato de (±)-cis-3-(N,N-dipropargilamino)-1-indanilo (110a).**



El mismo procedimiento descrito para **109a** (véase apartado 4.21) fue utilizado para la preparación de **110a** a partir de **92a** por reacción con cloruro de dimetilcarbamato y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, obteniéndose **110a** (Rdto. 66%) como un aceite transparente.

**Compuesto 110a:** Aceite transparente.

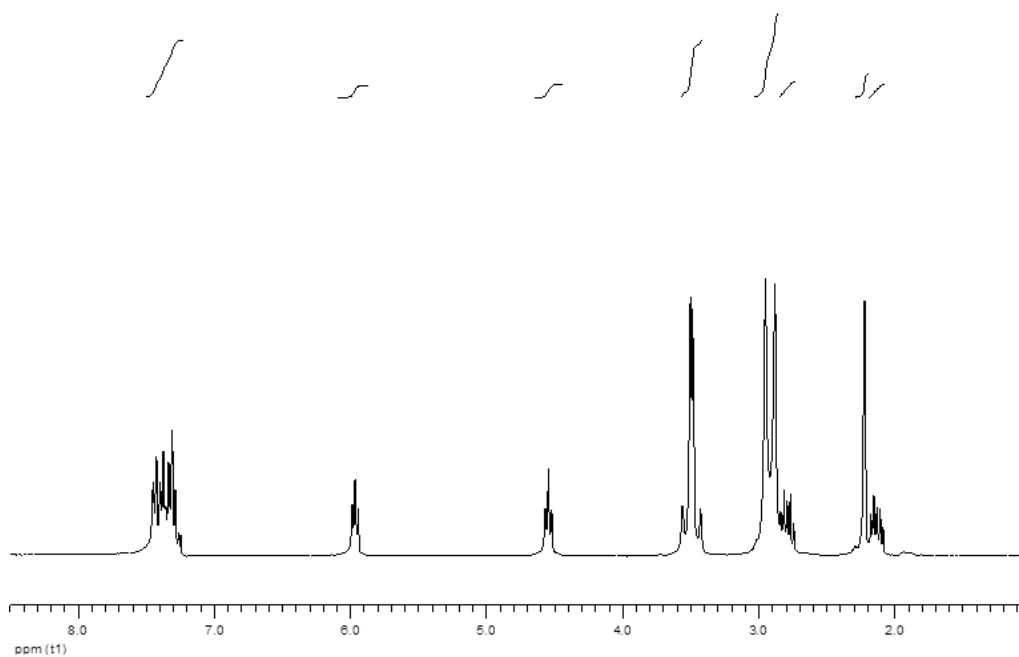
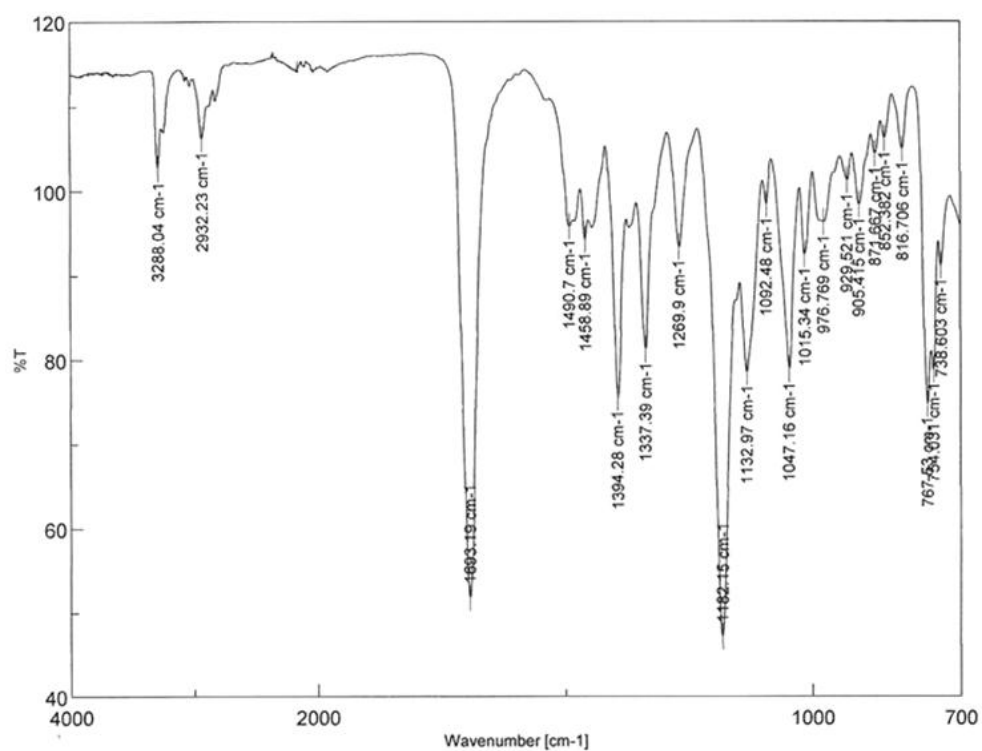
**IR  $\nu$**  = 3288, 2932, 1693, 1394, 1182, 1047  $\text{cm}^{-1}$ .

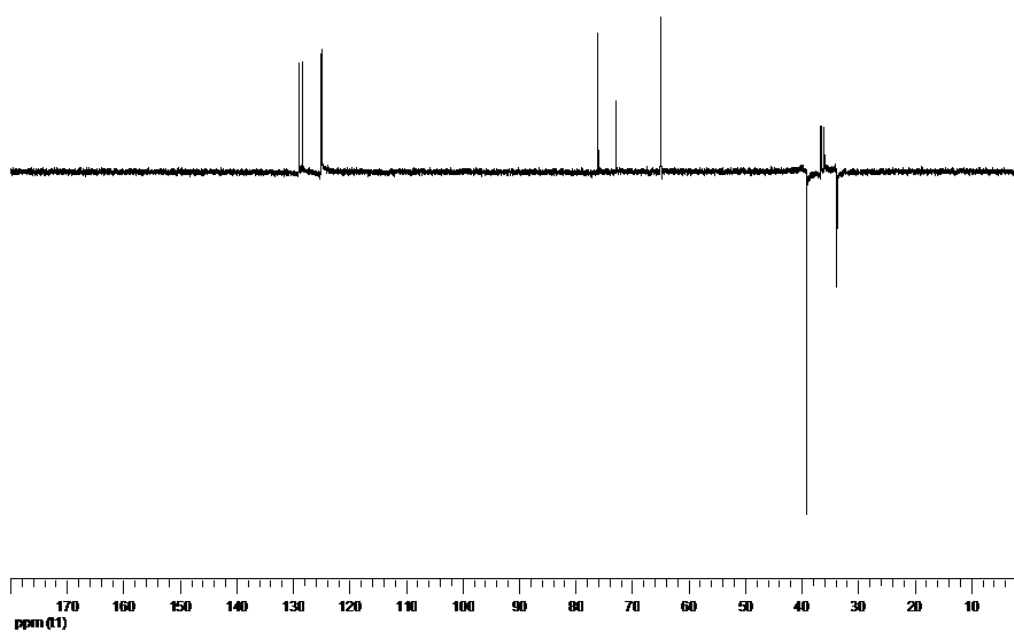
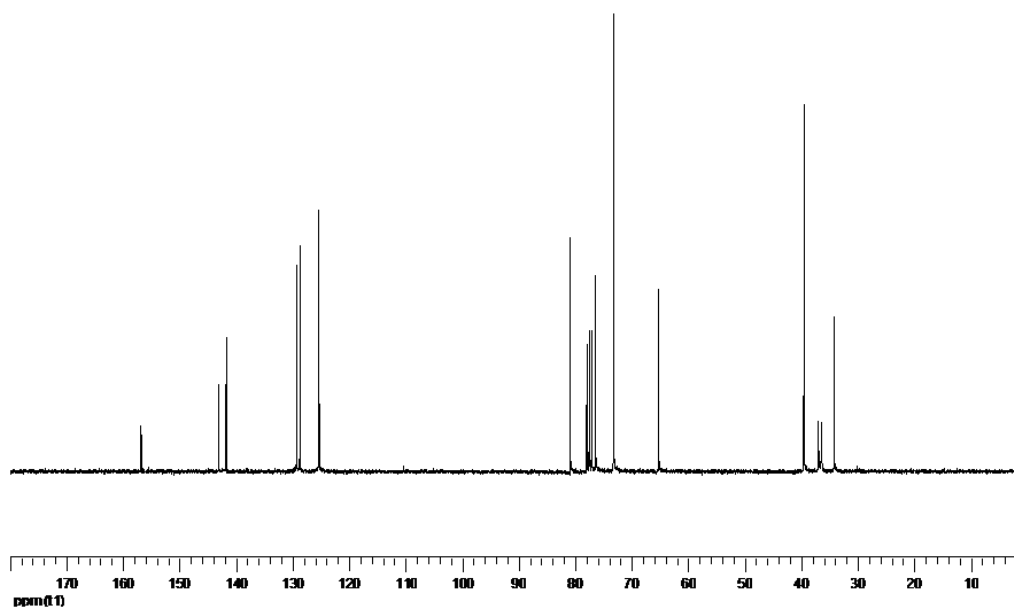
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 7.45-7.28 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.96 (t, 1H,  $J$  = 6.7 Hz, 1-H), 4.54 (t, 1H,  $J$  = 7.2 Hz, 3-H), 3.56-3.42 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.8 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.55-3.41 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.8 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.94-2.87 (m, 6H, 2 x  $\text{CH}_3$ ), 2.83-2.73 (m, 1H, 2 $\alpha$ -H), 2.21 (t, 2H,  $J$  = 2.2 Hz, 2 x CH), 2.17-2.08 (m, 1H, 2 $\beta$ -H).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 156.81 (CO), 143.07 (C-7a), 141.75 (C-3a), 129.26, 128.69, 125.33 y 125.28 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 80.80 (2 x  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 76.33 (C-1), 73.12 (2 x  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 65.15 (C-3), 39.40 (2 x  $\text{CH}_2$ ), 36.83 y 36.29 (2 x  $\text{CH}_3$ ), 34.02 (C-2).

**EM (FAB): m/z (%)**: 298 (11)  $[\text{M}+2]^+$ , 297 (57)  $[\text{M}+1]^+$ , 296 (4)  $[\text{M}]^+$ , 295 (13)  $[\text{M}-1]^+$ , 208 (100)  $[(\text{M}-1)^+-\text{carbamato}]$ , 154 (10), 137 (15), 115 (83).

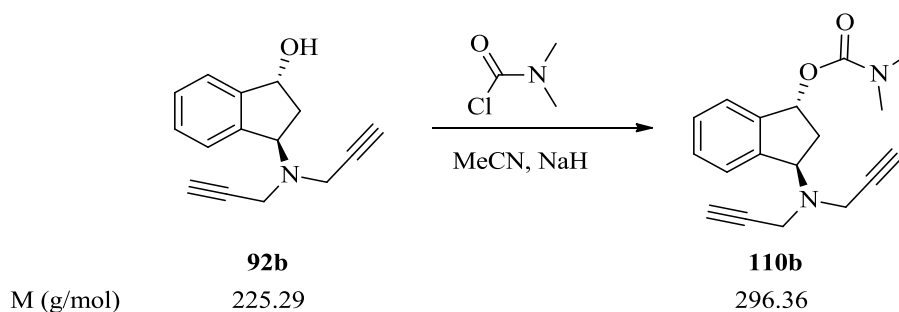
Análisis calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$  (296.36): C 72.95, H 6.80, N 9.45; encontrado C 73.18, H 6.72, N 9.49.







#### 4.24. Dimetilcarbamato de (±)-*trans*-3-(*N,N*-dipropargilamino)-1-indanilo (**110b**).



Sobre **92b** se aplicaron las condiciones descritas anteriormente para la preparación de **109a** (véase apartado 4.21) obteniéndose **110b** (Rdto. 54%) como un sólido blanco.

**Compuesto 110b:** Sólido blanco, p.f. 108-110°C-

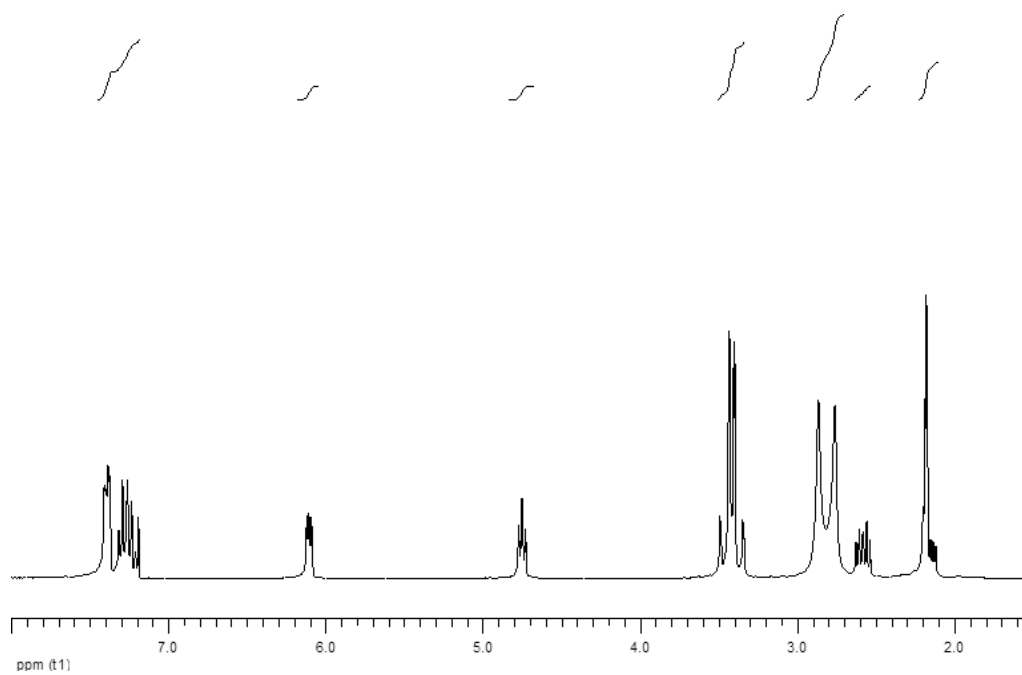
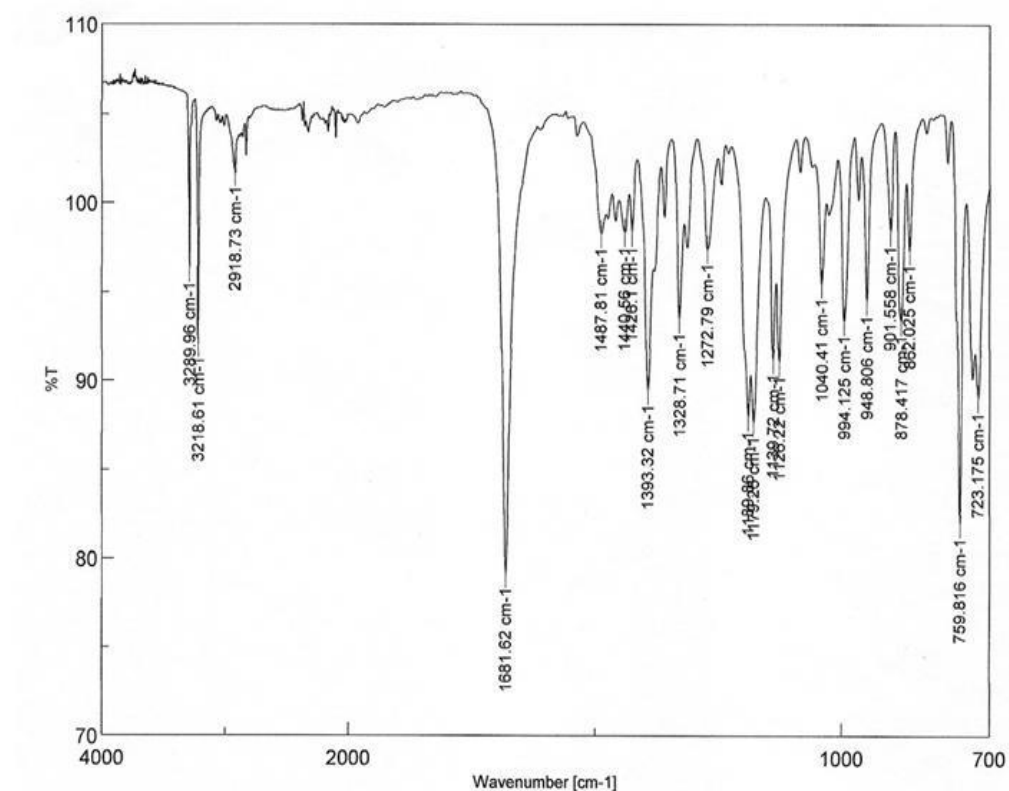
**IR**  $\nu$  = 3289, 3218, 2918, 1681, 1393, 1179, 1040  $\text{cm}^{-1}$ .

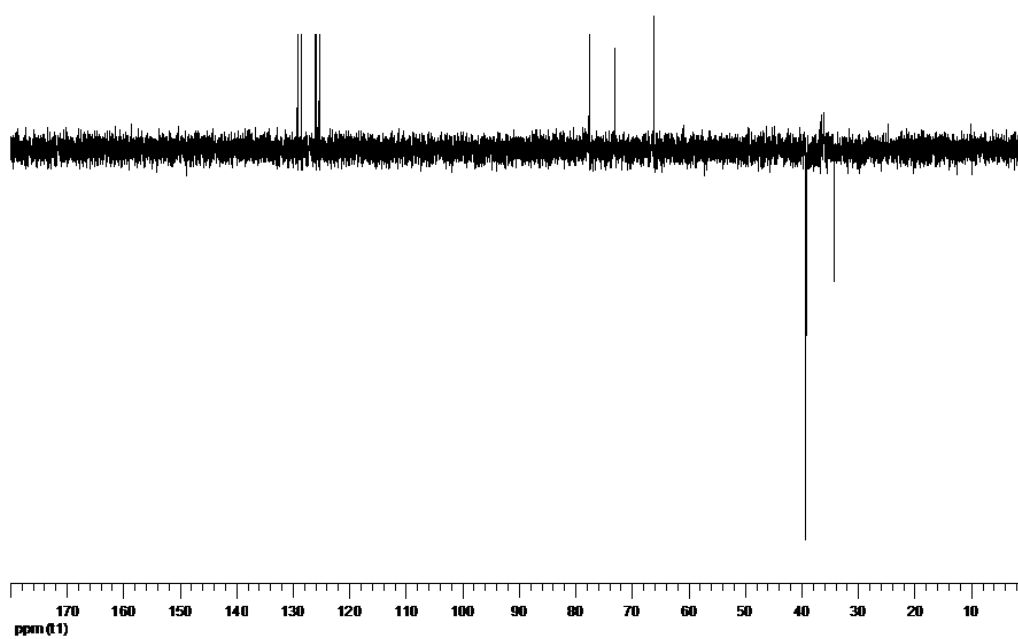
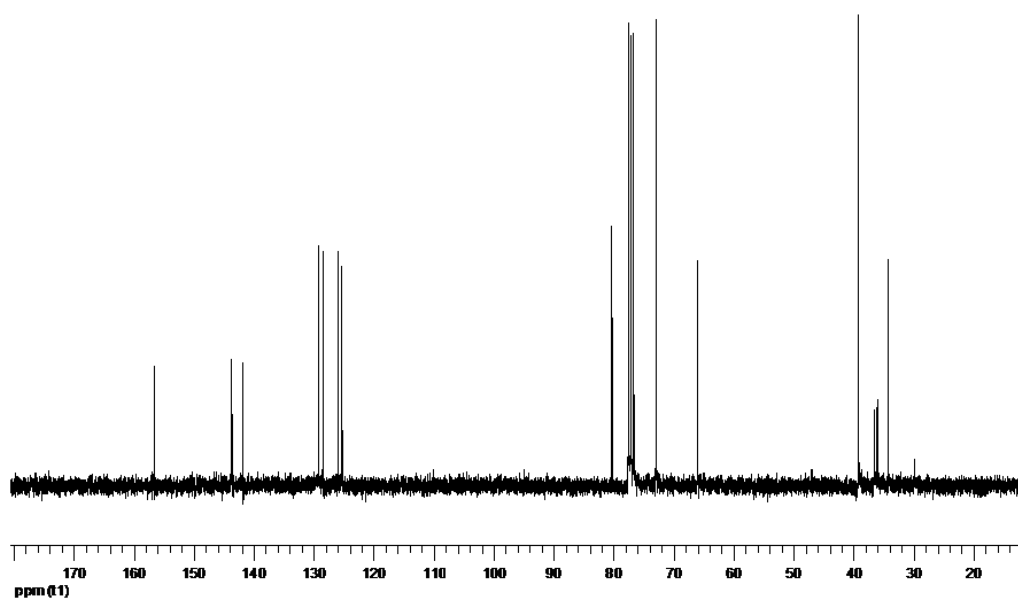
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 7.41-7.27 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.10 (dd, 1H,  $J$  = 6.9, 3.3 Hz, 1-H), 4.75 (t, 1H,  $J$  = 6.3 Hz, 3-H), 3.49-3.34 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.8 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.48-3.33 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.8 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.86-2.76 (m, 6H, 2 x  $\text{CH}_3$ ), 2.58 (dt, 1H,  $J$  = 12.8, 6.4 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.20-2.11 (m, 3H, 2 $\beta$ -H, 2 x CH).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 156.57 (CO), 143.63 (C-7a), 141.75 (C-3a), 129.14, 128.40, 125.87 y 125.24 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 80.19 (2 x  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 77.40 (C-1), 72.86 (2 x  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 65.92 (C-3), 39.07 (2 x  $\text{CH}_2$ ), 36.40 y 35.91 (2 x  $\text{CH}_3$ ), 34.13 (C-2).

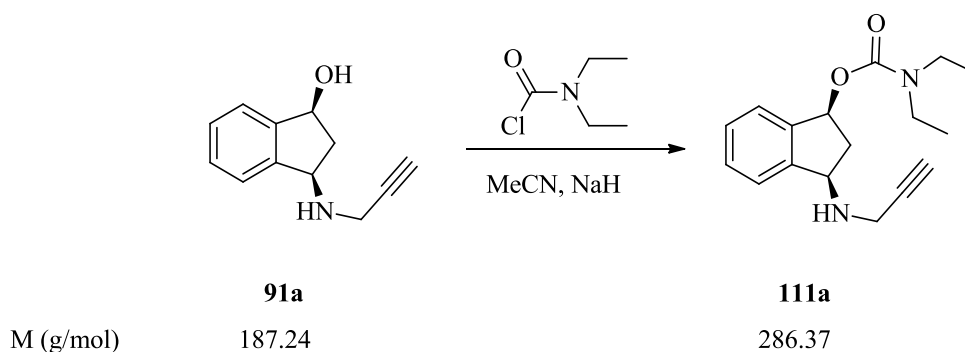
**EM (FAB): m/z (%):** 298 (3)  $[\text{M}+2]^+$ , 297 (16)  $[\text{M}+1]^+$ , 231 (59), 208 (1)  $[(\text{M}-1)^+ - \text{carbamato}]$ , 154 (90), 137 (100), 115 (6).

Análisis calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$  (296.36): C 72.95, H 6.80, N 9.45; encontrado C 73.11, H 6.72, N 9.53.





**4.25. Dietilcarbamato de (±)-cis-3-(N-propargilamino)-1-indanilo (111a).**



Siguiendo idéntico procedimiento al descrito para la preparación de **109a** (véase apartado 4.21) se obtuvo **111a** a partir de **91a** por reacción con cloruro de dietilcarbamoilo y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, obteniéndose **111a** (Rdto. 41%) como un sólido blanco.

**Compuesto 111a:** Sólido blanco, p.f. 52-54°C.

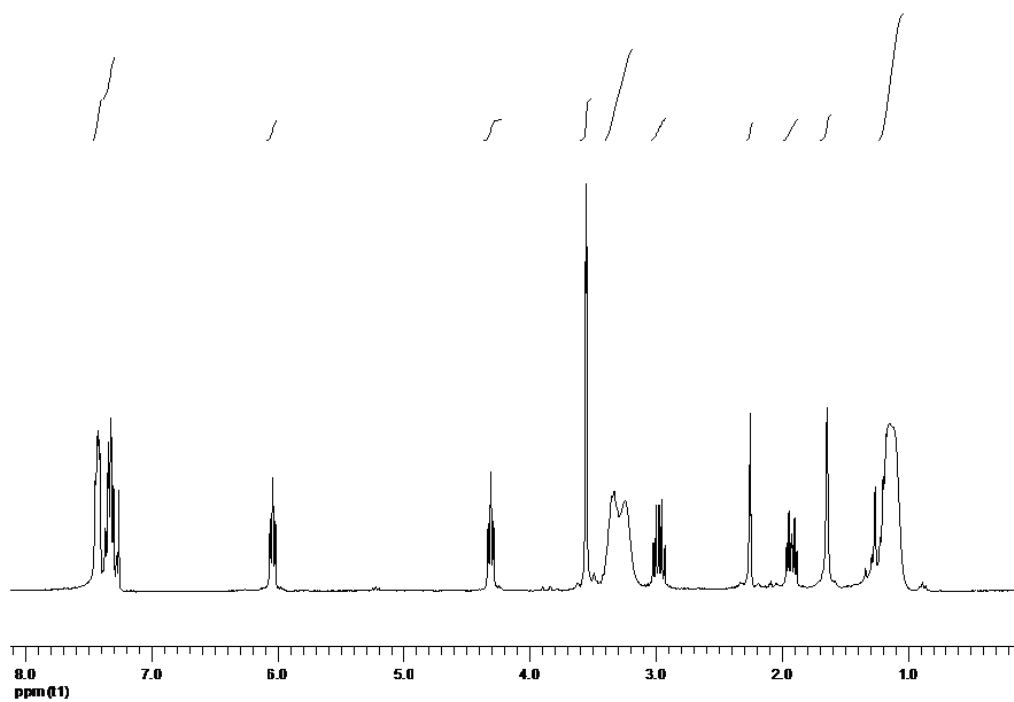
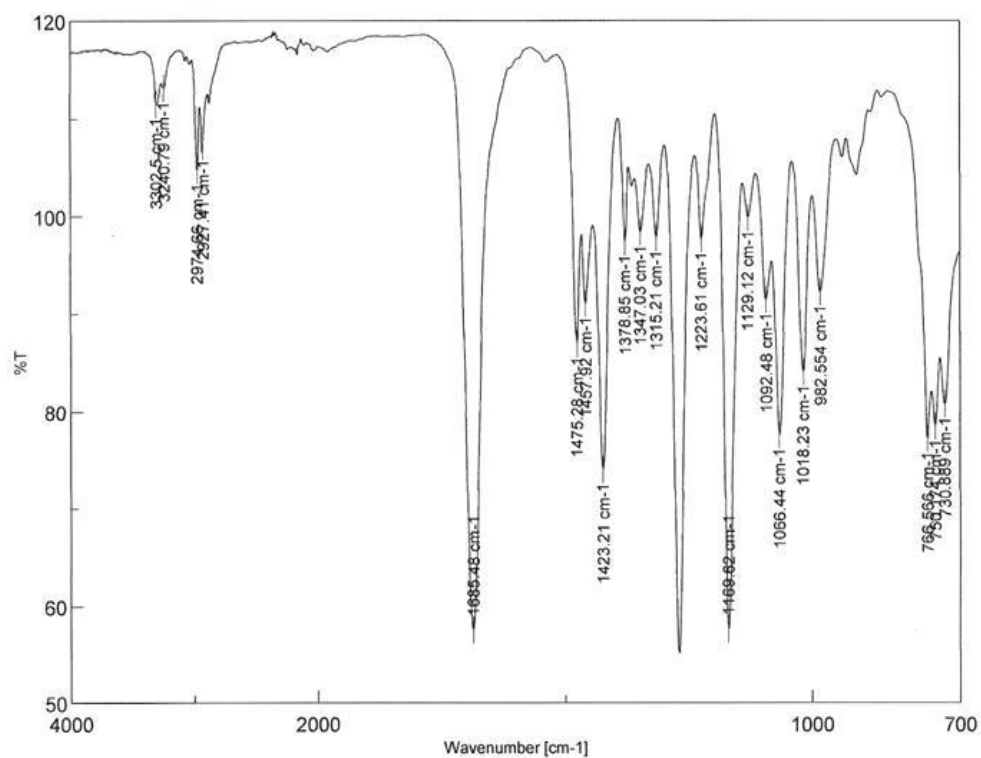
**IR  $\nu$**  = 3302, 2974, 1685, 1475, 1423, 1169, 1066  $\text{cm}^{-1}$ .

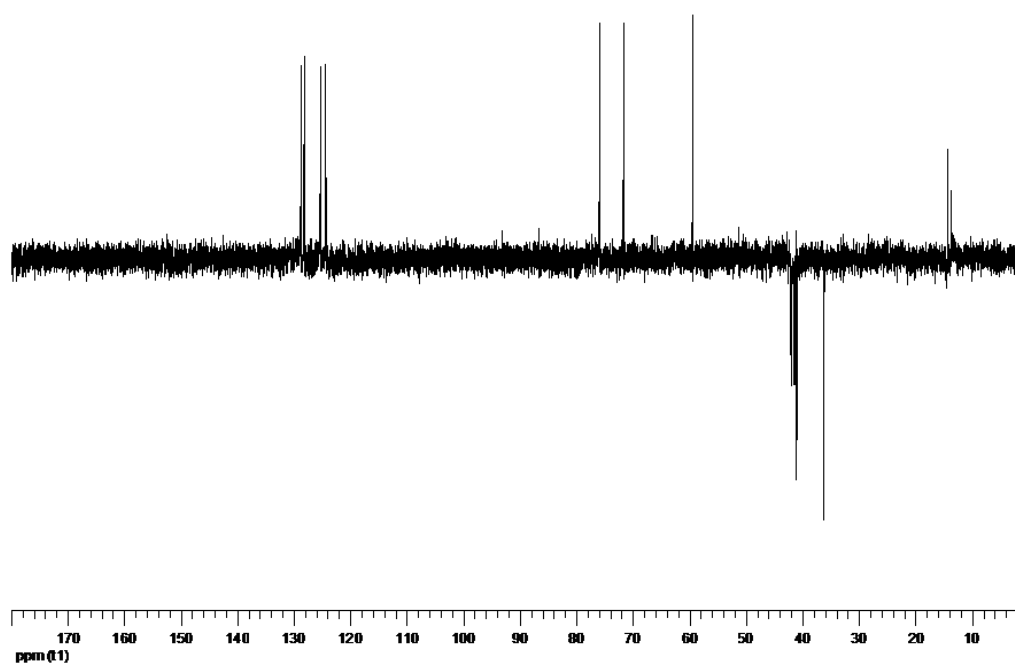
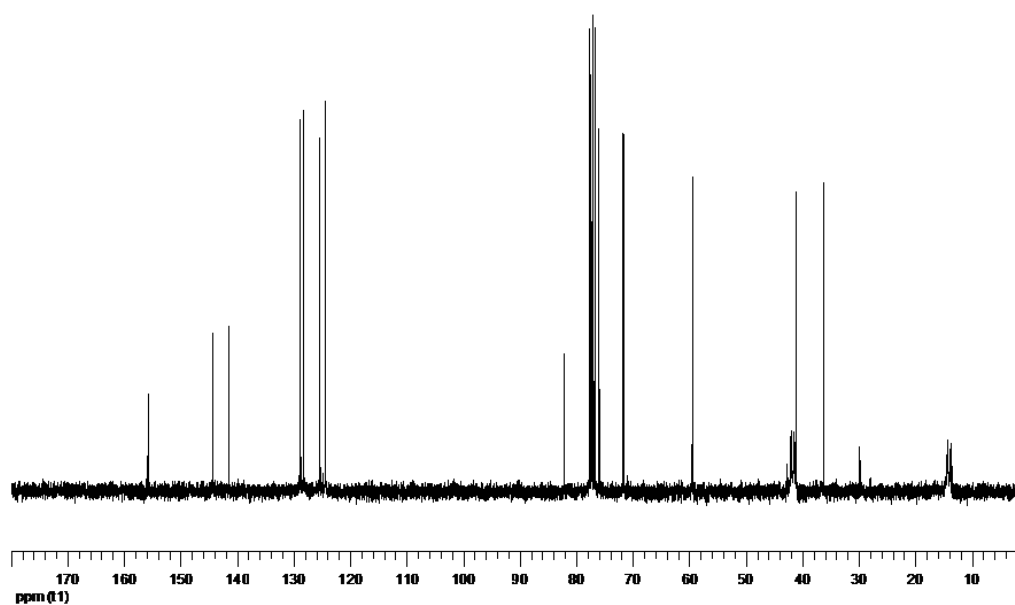
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 7.44-7.27 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.03 (t, 1H,  $J$  = 6.2 Hz, 1-H), 4.29 (t, 1H,  $J$  = 6.3 Hz, 3-H), 3.54-3.53 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.34-3.23 (m, 4H, 2 x  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3.01-2.91 (m, 1H, 2 $\alpha$ -H), 2.49-2.23 (m, 1H, CH), 1.90 (dt, 1H,  $J$  = 13.4, 5.6 Hz, 2 $\beta$ -H), 1.63 (s. an., 1H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH), 1.16-1.14 (m, 6H, 2 x  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 155.74 (CO), 144.24 (C-7a), 141.46 (C-3a), 128.74, 128.15, 125.29 y 124.32 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 82.08 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 75.84 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 71.56 (C-1), 59.32 (C-3), 41.85 y 41.27 (2 x  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 40.93 ( $\text{CH}_2$ ), 36.09 (C-2), 14.16 y 13.56 (2 x  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ).

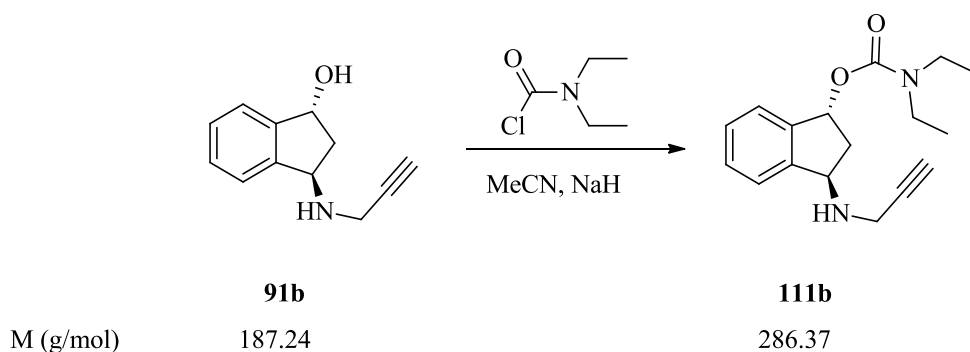
**EM (FAB): m/z (%)**: 288 (83)  $[\text{M}+2]^+$ , 287 (51)  $[\text{M}+1]^+$ , 286 (4)  $[\text{M}]^+$ , 231 (82), 154 (46), 137 (60), 115 (24).

Análisis calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$  (286.37): C 71.30, H 7.74, N 9.78; encontrado C 71.02, H 7.88, N 9.81.





**4.26. Dietilcarbamato de (±)-trans-3-(N-propargilamino)-1-indanilo (111b).**



El compuesto **111b** se preparó a partir de **91b** usando la metodología descrita anteriormente (véase apartado 4.21) por reacción con cloruro de dietilcarbamoilo y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, obteniéndose **111b** (Rdto. 26%) como un aceite amarillo.

**Compuesto 111b:** Aceite amarillo.

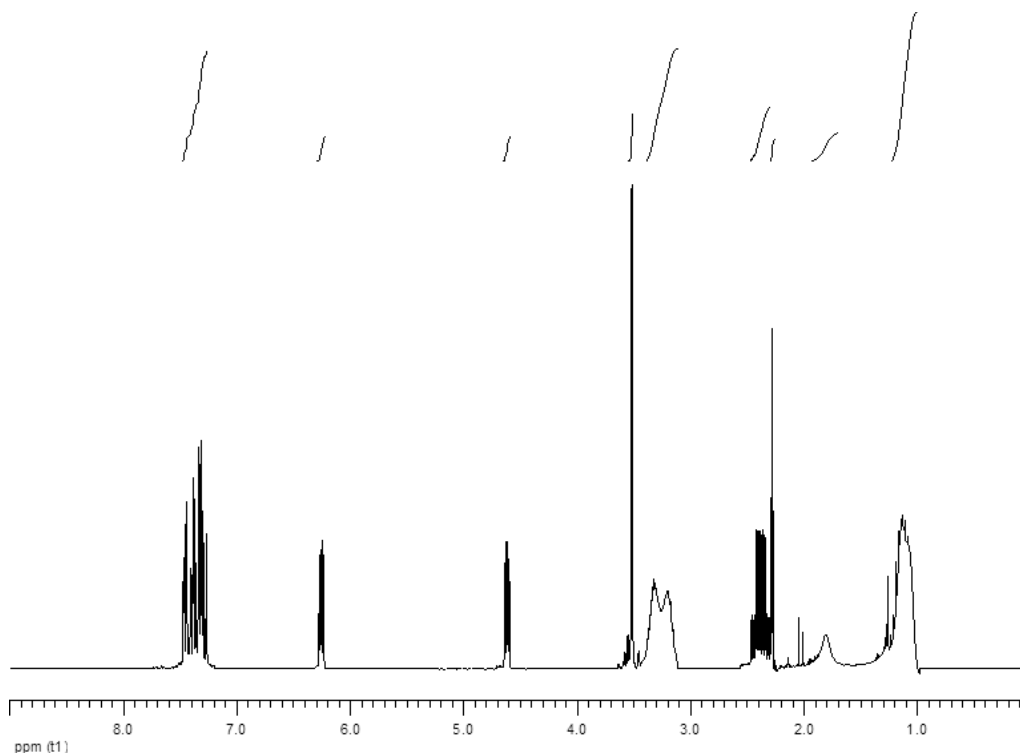
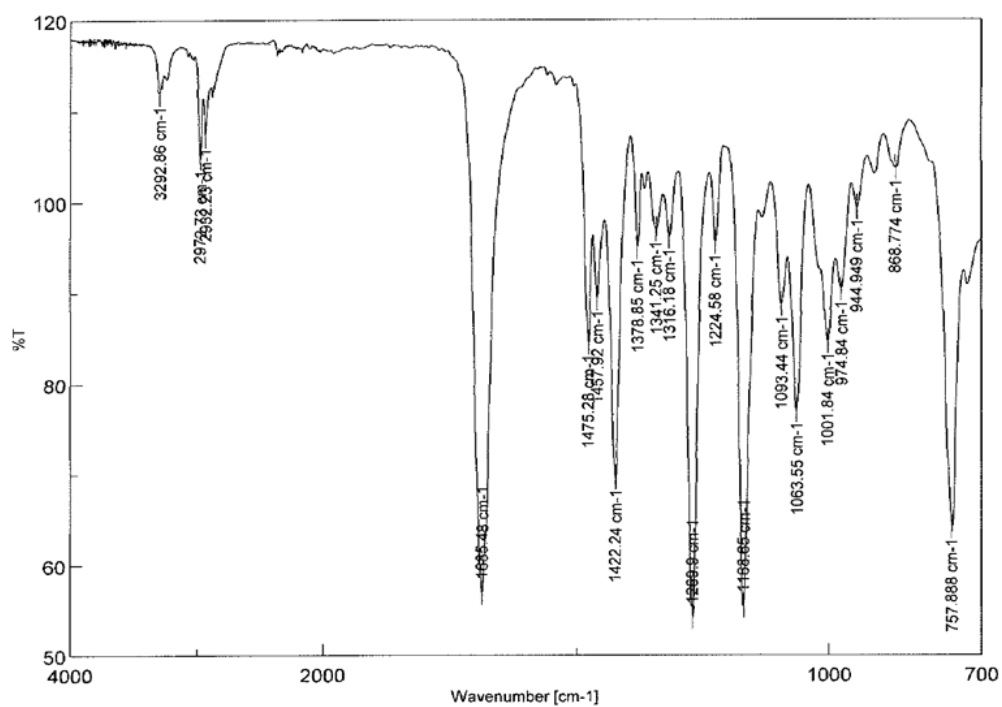
**IR v** = 3292, 2972, 1685, 1422, 1269, 1168, 1063 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ** = 7.41-7.27 (m, 4H, H<sub>arom</sub>), 6.26 (dd, 1H, *J* = 6.5, 4.3 Hz, 1-H), 4.62 (dd, 1H, *J* = 6.4, 4.9 Hz, 3-H), 3.54-3.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.38-3.15 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.46-2.29 (m, 2H, 2α-H, 2β-H), 2.27 (t, 1H, *J* = 2.3 Hz, CH), 1.80 (s. an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, NH), 1.20-1.08 (m, 6H, 2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

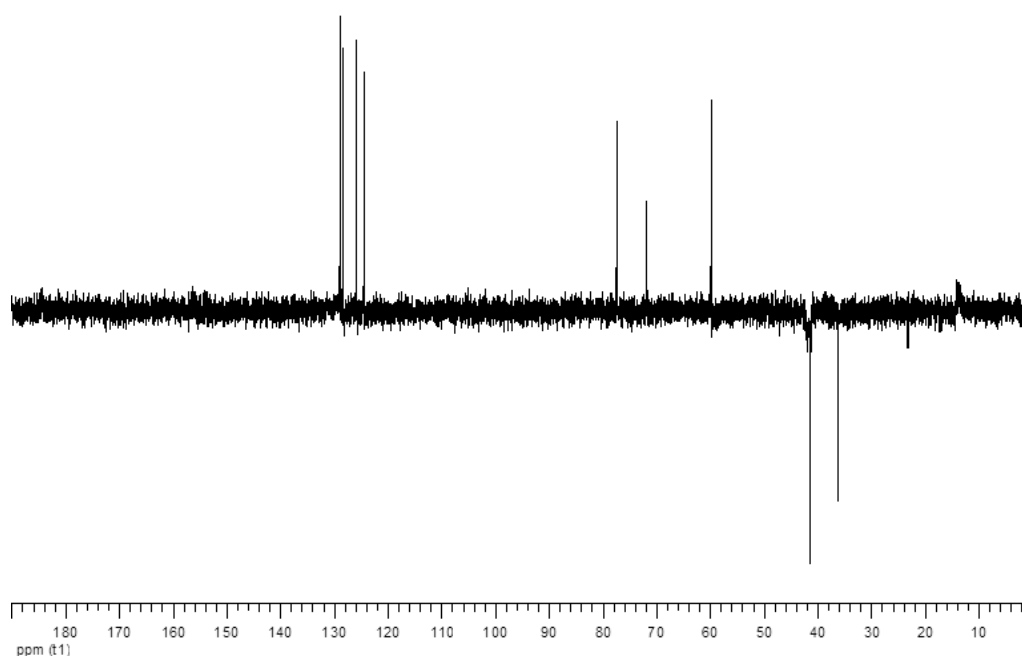
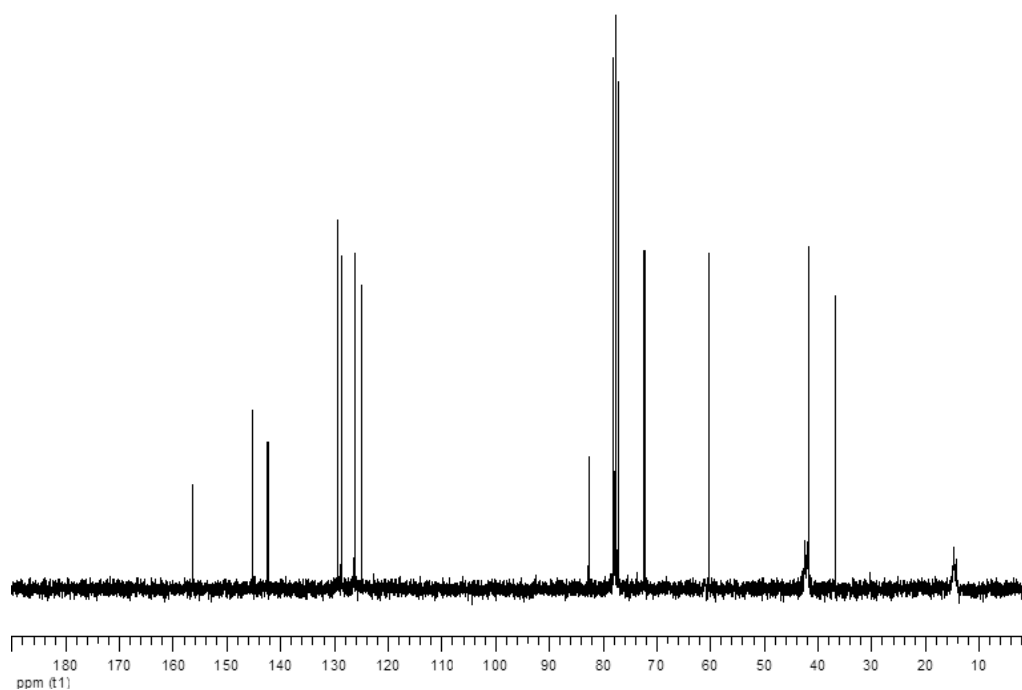
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ** = 155.90 (CO), 144.80 (C-7a), 141.90 (C-3a), 128.84, 128.23, 125.76 y 124.34 (CH<sub>arom</sub>), 82.11 (C≡CH), 77.15 (C≡CH), 71.72 (C-1), 59.66 (C-3), 42.21 y 41.76 (2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 41.14 (CH<sub>2</sub>), 36.12 (C-2), 14.08 y 13.63 (2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

**EM (ESI): m/z (%):** 288 (7) [M+2]<sup>+</sup>, 287 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 232 (50) [M<sup>+</sup>-propargilamino], 115 (58).

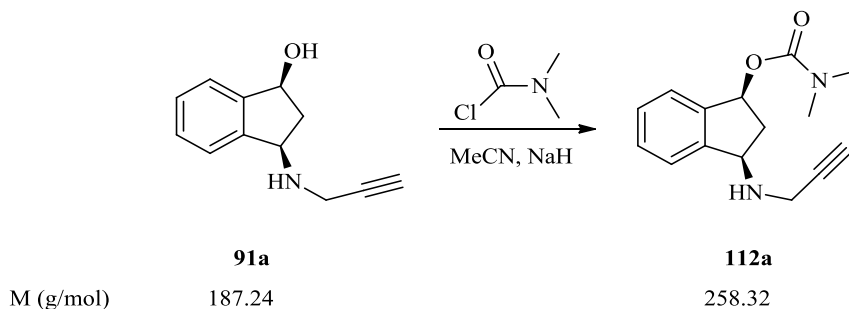
Análisis calculado para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (286.37): C 71.30, H 7.74, N 9.78; encontrado C 71.12, H 7.92, N 9.90.







**4.27. Dimetilcarbamato de (±)-*cis*-3-(*N*-propargilamino)-1-indanilo (112a).**



Por reacción de **91a** con cloruro de dimetilcarbamato y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, siguiendo las condiciones descritas anteriormente (véase apartado 4.21), se ha obtenido **112a** (Rdto. 32%) como un sólido amarillo.

**Compuesto 112a:** Sólido amarillo, p.f. 73-75°C.

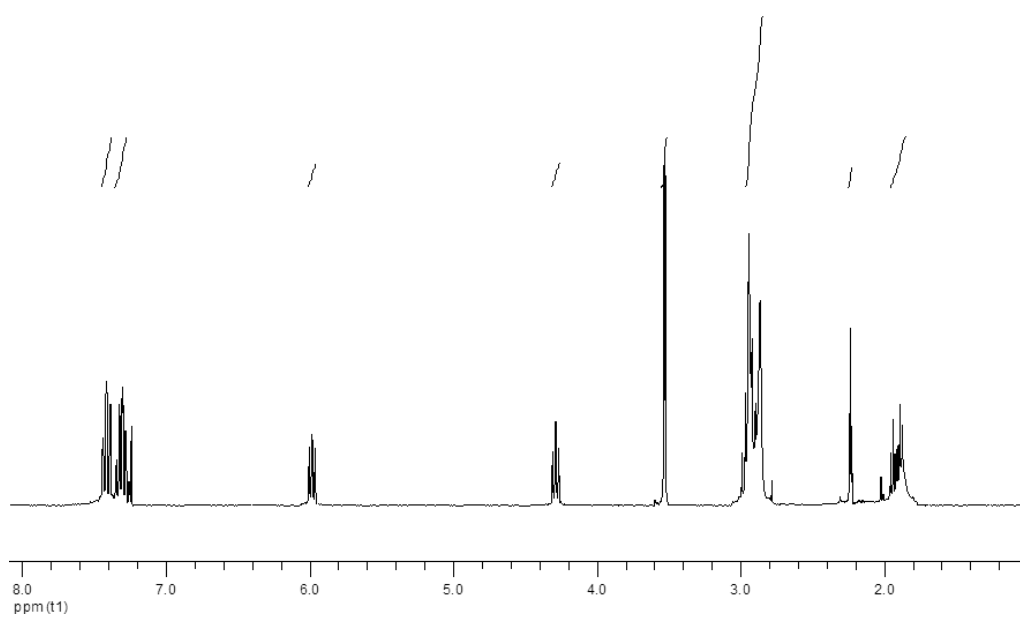
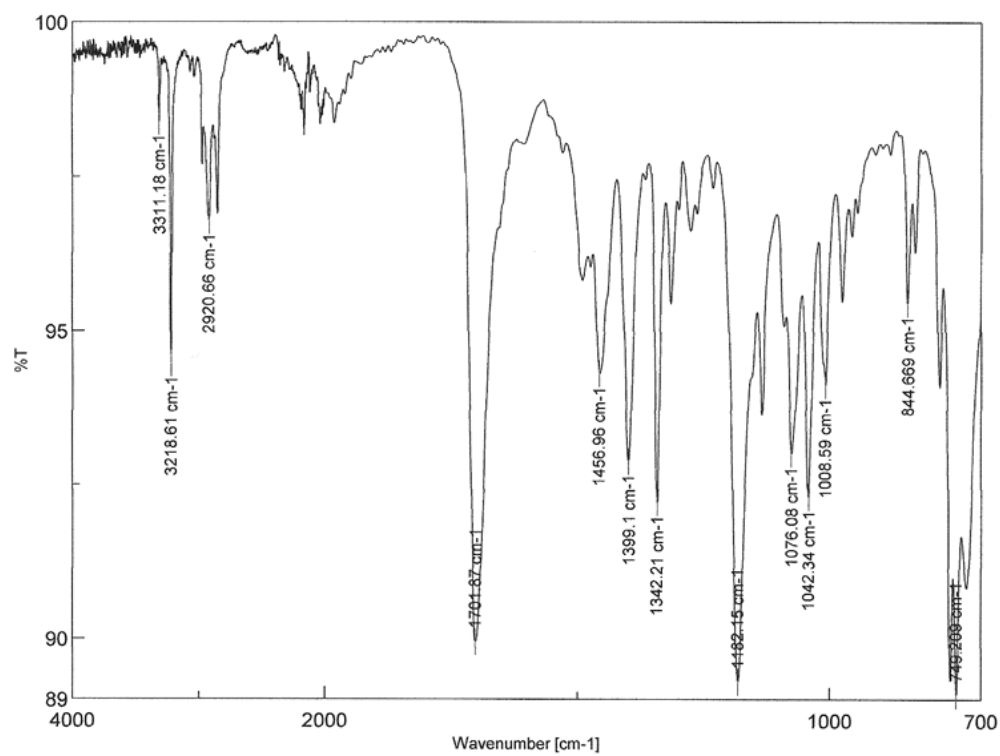
**IR**  $\nu$  = 3218, 2920, 1701, 1342, 1182, 1042  $\text{cm}^{-1}$ .

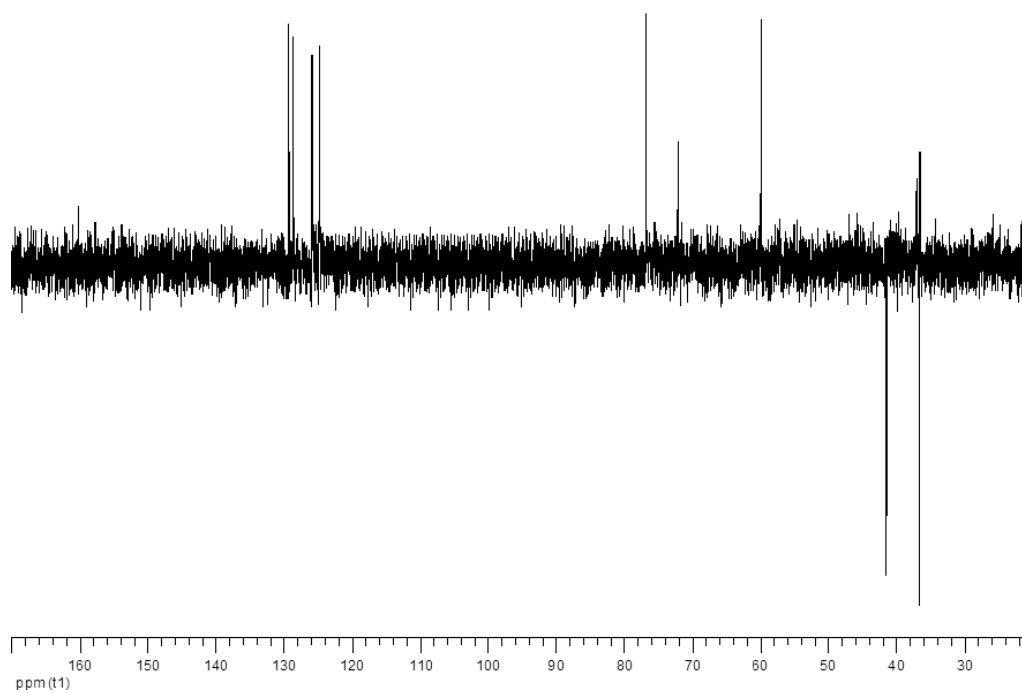
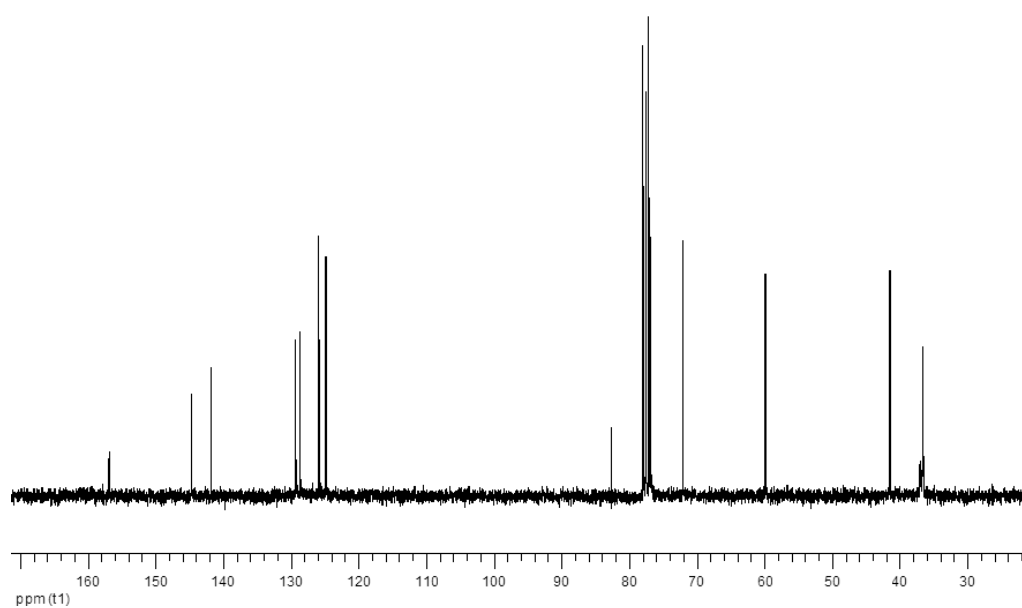
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 7.44-7.27 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.96-5.91 (m, 1H, 1-H), 4.24 (t, 1H,  $J$  = 6.4 Hz, 3-H), 3.48 (d, 2H,  $J$  = 2.4 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.94-2.85 (m, 7H, 2 x  $\text{CH}_3$ , 2 $\alpha$ -H), 2.19-2.17 (m, 1H, CH), 1.95-1.86 (m, 2H, 2 $\beta$ -H, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH).

**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 156.47 (CO), 144.32 (C-7a), 141.36 (C-3a), 128.44, 128.19, 125.43 y 124.39 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 82.12 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 76.28 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 71.58 (C-1), 59.36 (C-3), 40.91 ( $\text{CH}_2$ ), 36.47 ( $\text{CH}_3$ ), 36.10 (C-2), 35.98 ( $\text{CH}_3$ ).

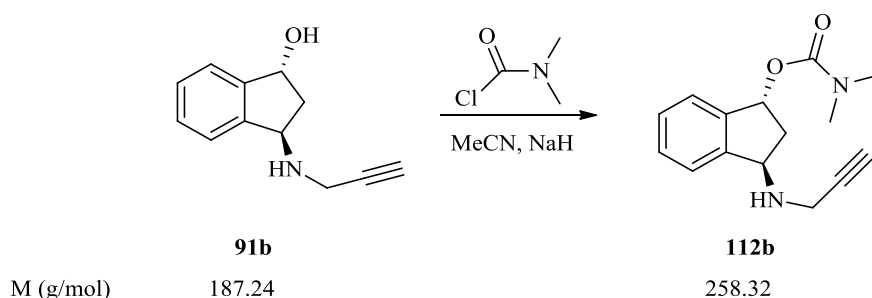
**EM (EI): m/z (%):** 261 (2)  $[\text{M}+3]^+$ , 186 (2)  $[(\text{M}-1)\text{-carbamato}]^+$ , 130 (47), 116 (95).

Análisis calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$  (258.32): C 69.74, H 7.02, N 10.84; encontrado C 69.51, H 7.17, N 11.02.





**4.28. Dimetilcarbamato de (±)-*trans*-3-(*N*-propargilamino)-1-indanilo (112b).**



El mismo procedimiento descrito para **109a** (véase apartado 4.21) fue utilizado para la preparación de **112b** a partir de **91b** por reacción con cloruro de dimetilcarbamato y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, obteniéndose **112b** (Rdto. 43%) como un sólido amarillo.

**Compuesto 112b:** Aceite amarillo

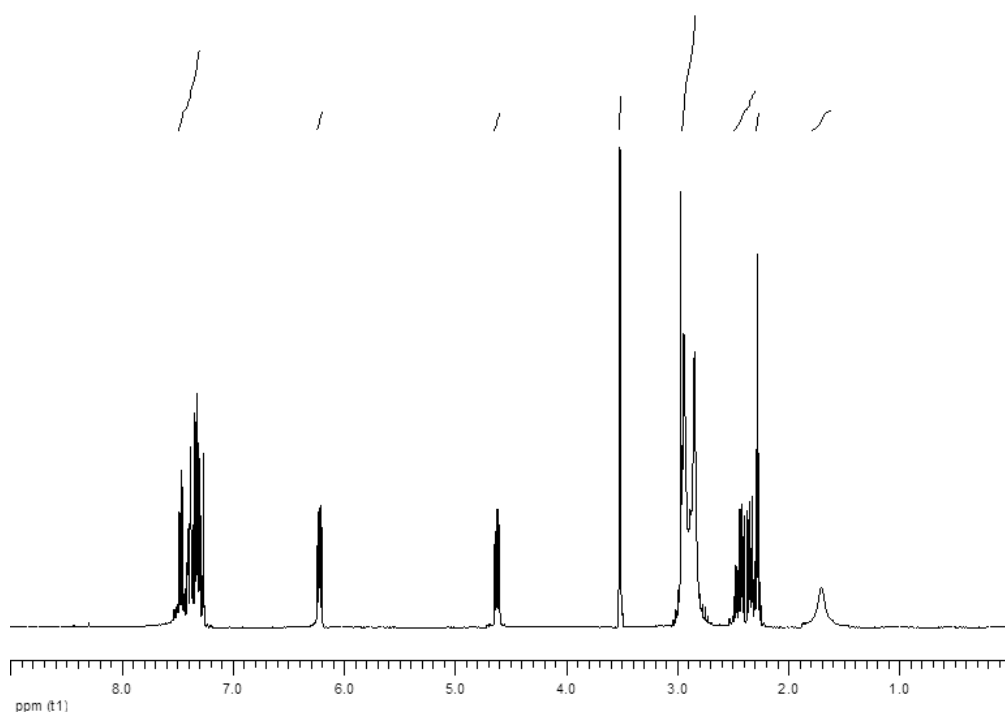
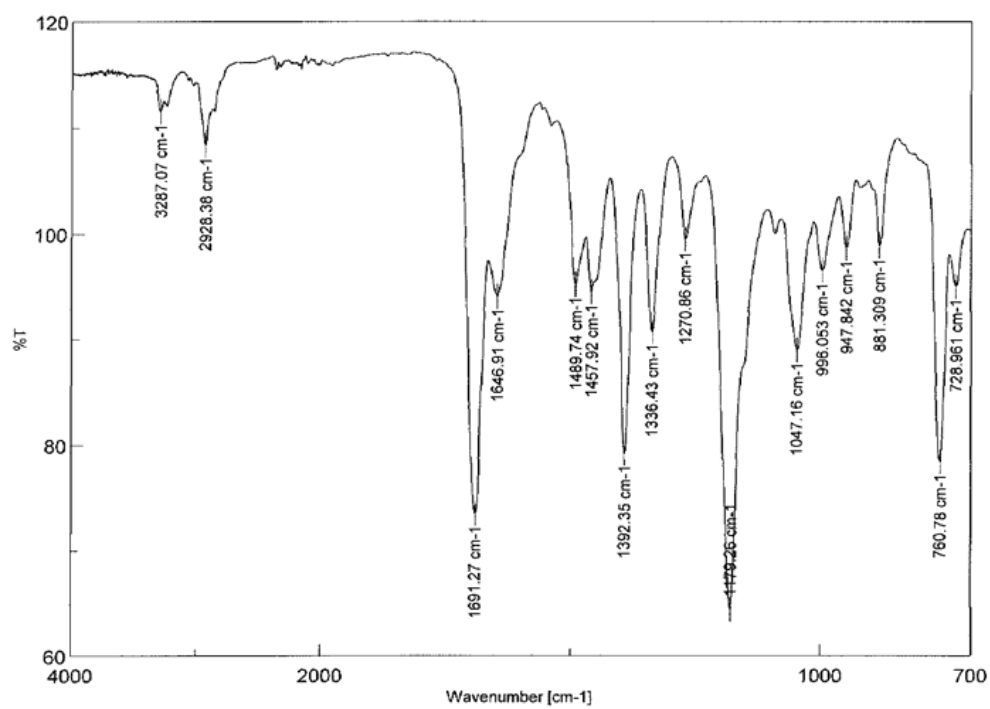
**IR**  $\nu$  = 3287, 2928, 1691, 1392, 1179, 1047  $\text{cm}^{-1}$ .

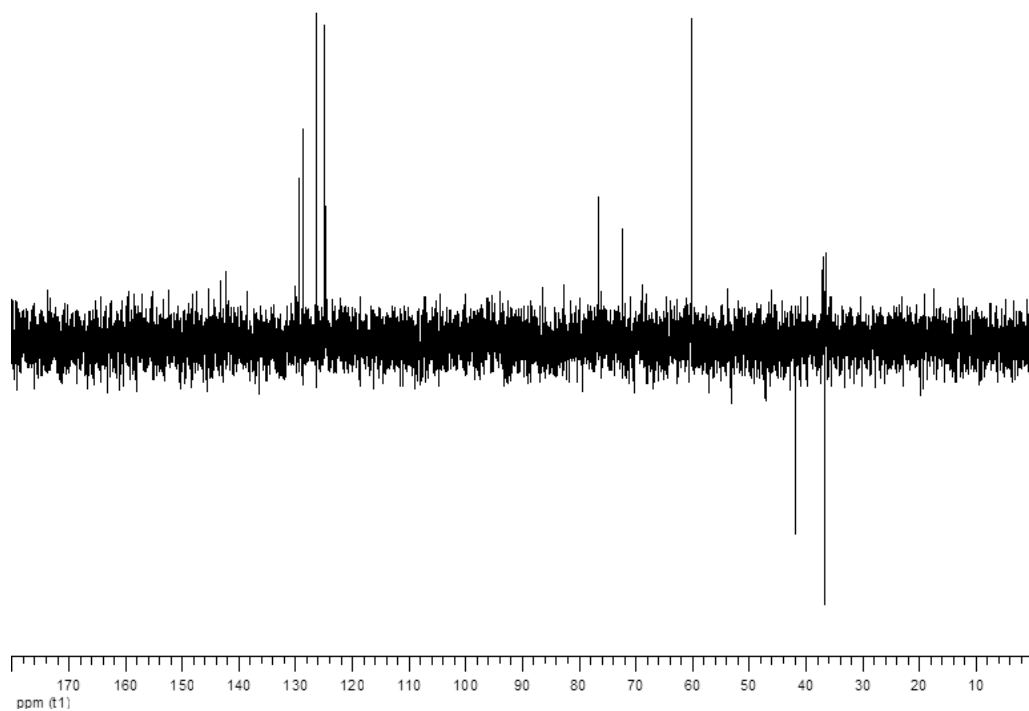
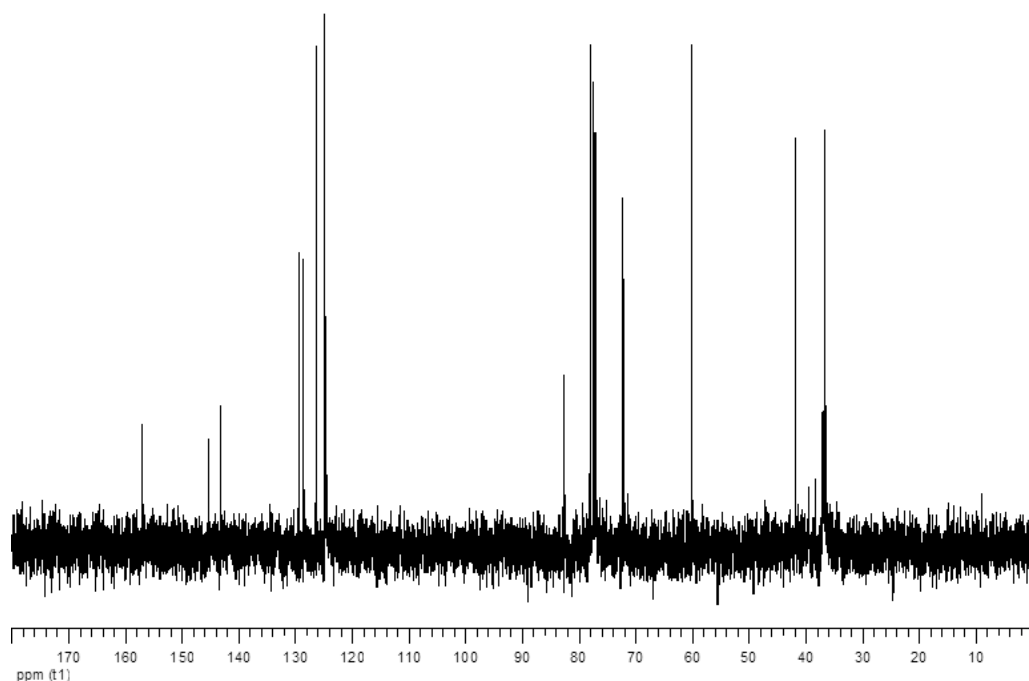
**$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 7.49-7.29 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.22 (dd, 1H,  $J$  = 6.6, 4.1 Hz, 1-H), 4.62 (dd, 1H,  $J$  = 6.3, 5.0 Hz, 3-H), 3.52 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.96-2.94 (m, 6H, 2 x  $\text{CH}_3$ ), 2.48-2.30 (m, 2H,  $2\beta\text{-H}$ ,  $2\alpha\text{-H}$ ), 2.27 (t, 1H,  $J$  = 2.4 Hz, CH), 1.70 (s. an, 1H, , intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH).

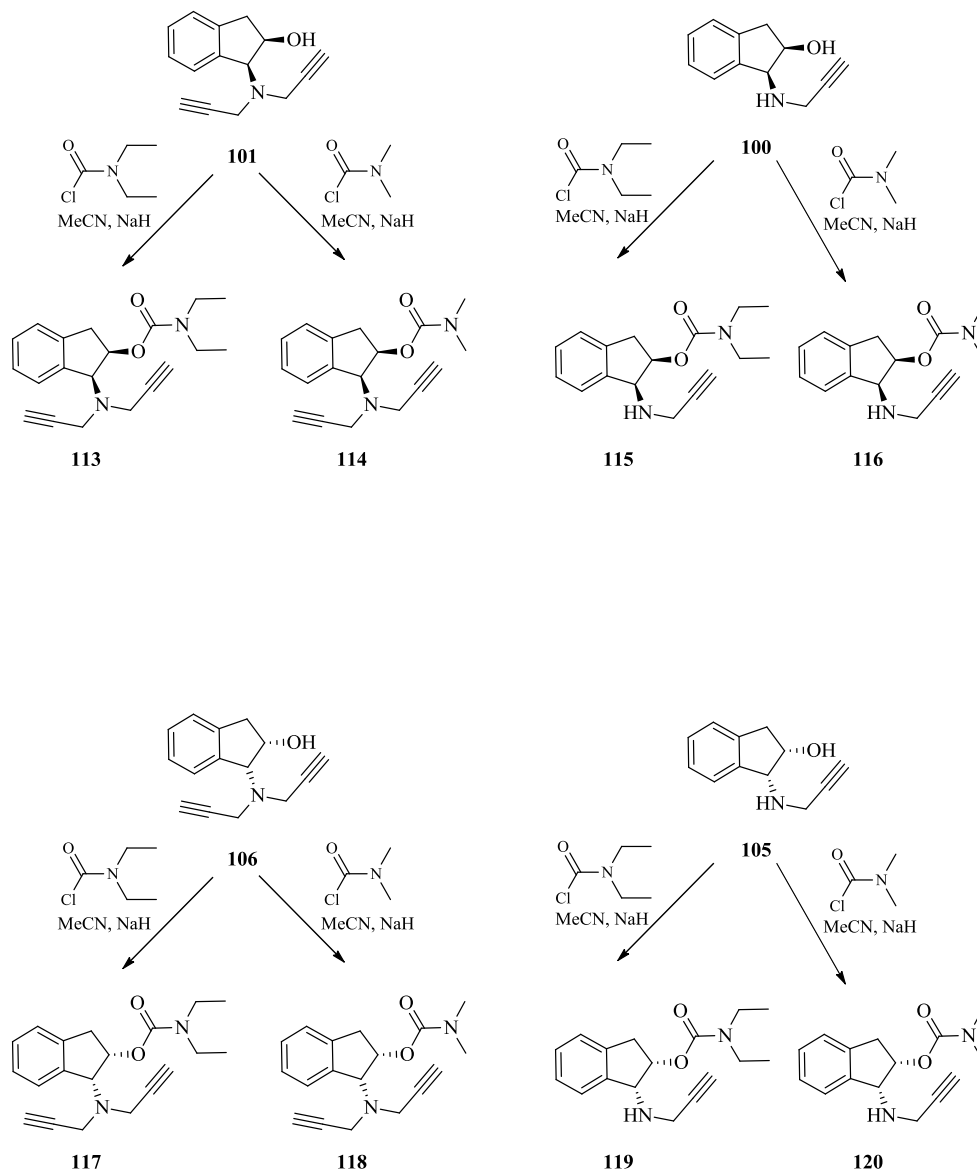
**$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 156.96 (CO), 145.23 (C-7a), 143.04 (C-3a), 129.32, 128.62, 126.25 y 124.71 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 82.48 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 76.32 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 72.12 (C-1), 60.01 (C-3), 41.61 ( $\text{CH}_2$ ), 36.82 ( $\text{CH}_3$ ), 36.50 (C-2) y 36.36 ( $\text{CH}_3$ ).

**EM (ESI):  $m/z$  (%):** 259 (7)  $[\text{M}+1]^+$ , 204 (7)  $[(\text{M}-1)\text{-propargilamino}]^+$ , 115 (100).

Análisis calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$  (258.32): C 69.74, H 7.02, N 10.84; encontrado C 69.63, H 7.05, N 10.97.

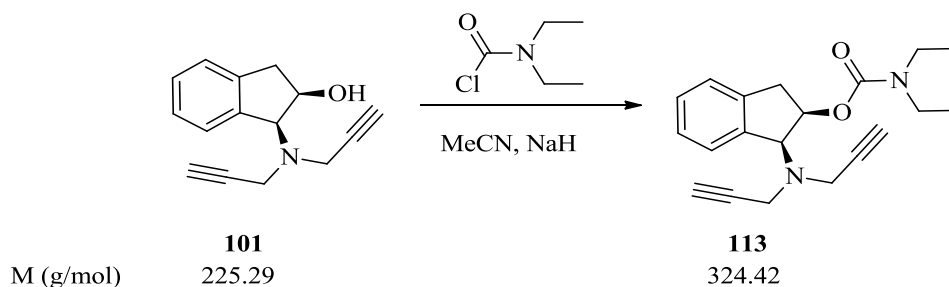








**4.29. Dietilcarbamato de (1S,2R)-(-)-cis-1-(N,N-dipropargilamino)-2-indanilo (113).**



A partir de **101** y siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.21, por reacción con cloruro de dietilcarbamoilo y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, se ha obtenido **113** (49%), como un aceite transparente.

**Compuesto 113:** Aceite transparente.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25^\circ\text{C}} = -18.6^\circ$  (25°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

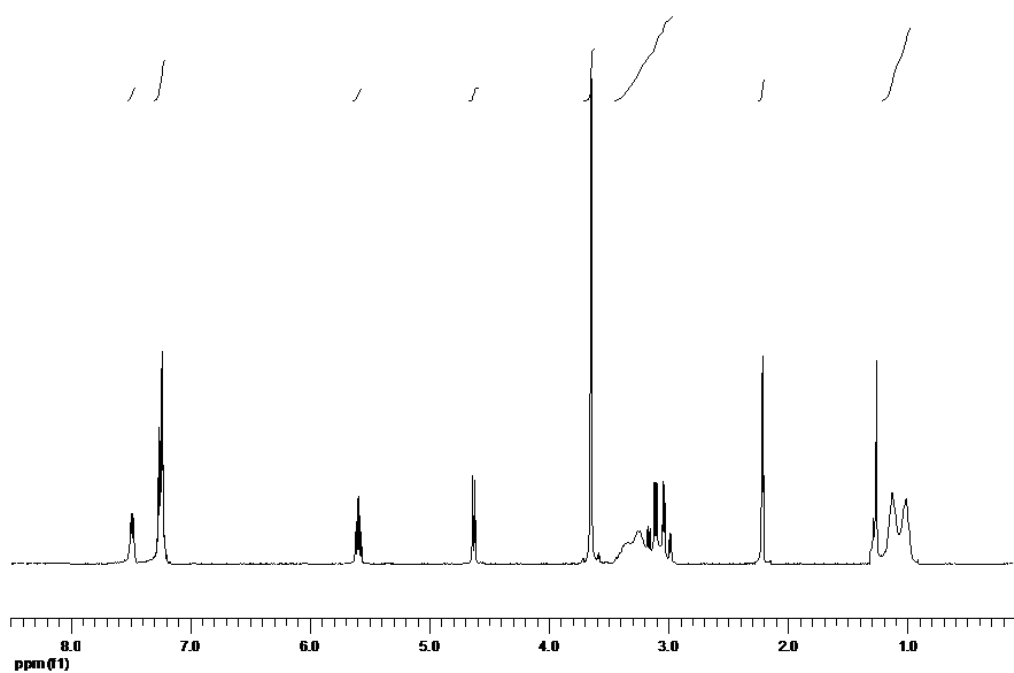
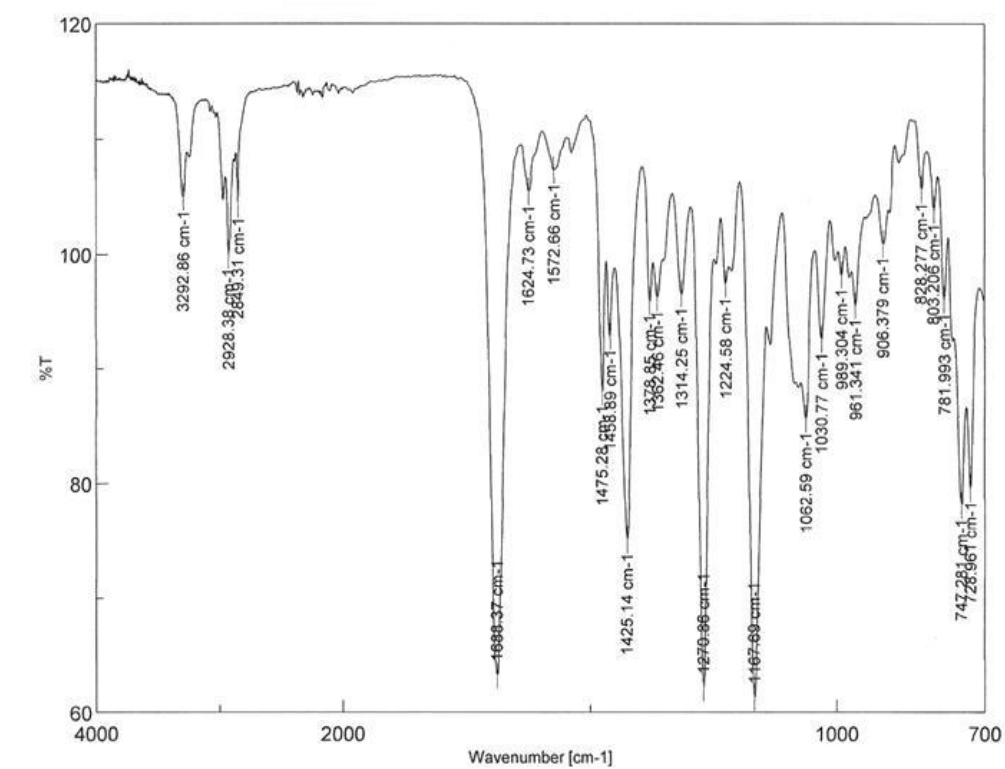
**IR**  $\nu = 3292, 2928, 1688, 1425, 1270, 1167, 1062 \text{ cm}^{-1}$ .

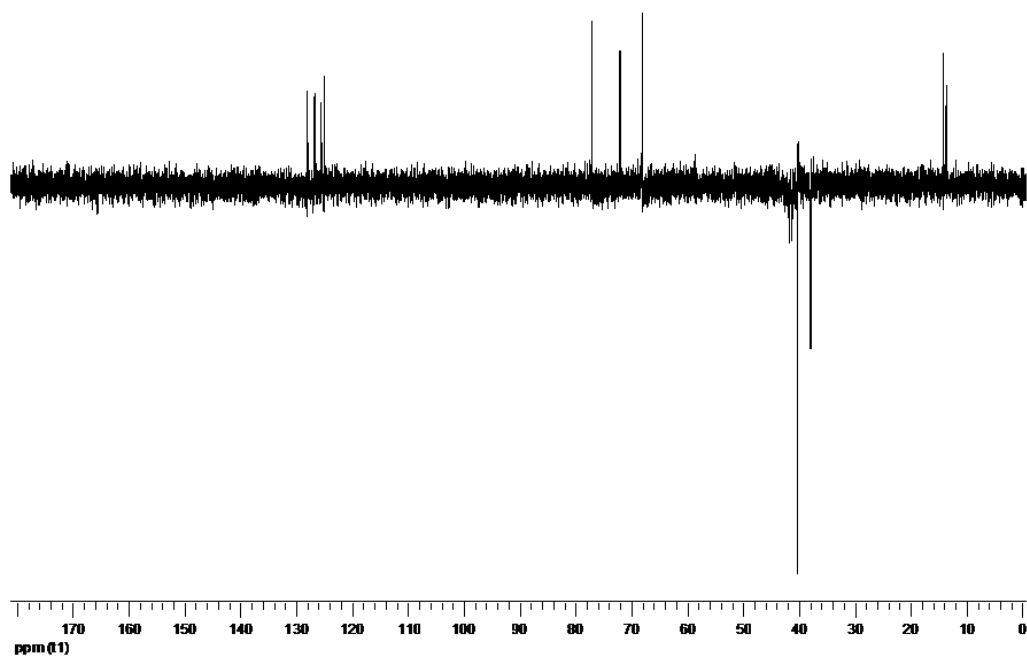
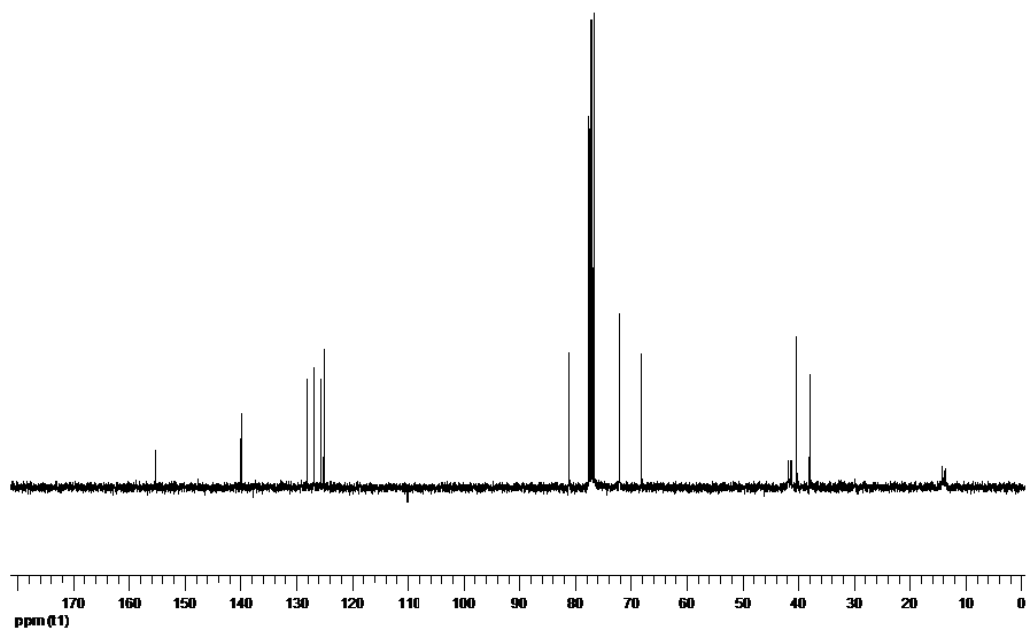
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta = 7.49$  (t, 1H,  $J = 4.2 \text{ Hz}$ , 7-H), 7.28-7.23 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 5.59 (dt, 1H,  $J = 5.8, 3.9 \text{ Hz}$ , 2-H), 4.62 (d, 1H,  $J = 5.8 \text{ Hz}$ , 1-H), 3.71-3.57 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>) 3.35-3.23 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.17-2.98 (sistema AB, 1H,  $J = 16.8 \text{ Hz}$ , 3 $\alpha$ -H), 3.15-2.97 (sistema AB, 1H,  $J = 16.8 \text{ Hz}$ , 3 $\beta$ -H), 2.21 (t, 2H,  $J = 2.2 \text{ Hz}$ , 2 x CH), 1.12-1.01 (m, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta = 155.21$  (CO), 139.98 (C-3a), 139.86 (C-7a), 128.00, 126.74, 125.55 y 125.01 (CH<sub>arom</sub>), 81.06 (2 x C $\equiv$ CH), 76.58 (C-2), 71.97 (2 x C $\equiv$ CH), 67.99 (C-1), 41.65 y 41.12 (2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 40.14 (2 x CH<sub>2</sub>), 37.81 (C-3), 13.97 y 13.47 (2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

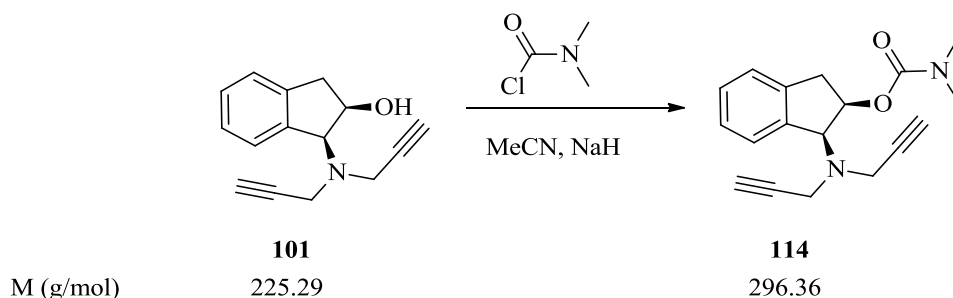
**EM (FAB): m/z (%):** 326 (20) [M+2]<sup>+</sup>, 325 (92) [M+1]<sup>+</sup>, 324 (2) [M]<sup>+</sup>, 323 (8) [M-1]<sup>+</sup>, 288 (89), 230 (51), 154 (71), 137 (100).

Análisis calculado para C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (324.42): C 74.04, H 7.46, N 8.64; encontrado C 73.89, H 7.61, N 8.75.





**4.30. Dimetilcarbamato de (1S,2R)-(-)-cis-1-(N,N-dipropargilamino)-2-indanilo (114).**



De manera análoga a la descrita en el apartado 4.21, por reacción con cloruro de dimetilcarbamoilo y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, y a partir de **101** se ha obtenido **114** (58%), como un sólido blanco.

**Compuesto 114:** Sólido blanco, p.f. 109-112°C.

$[\alpha]_D^{25} = -38^\circ$  (25°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

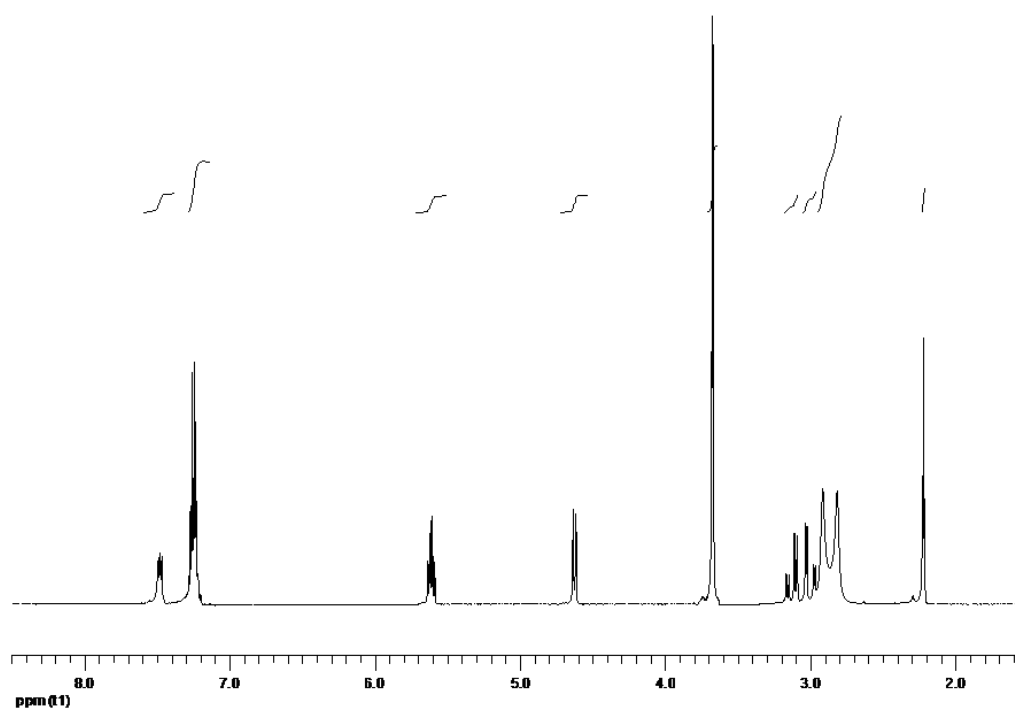
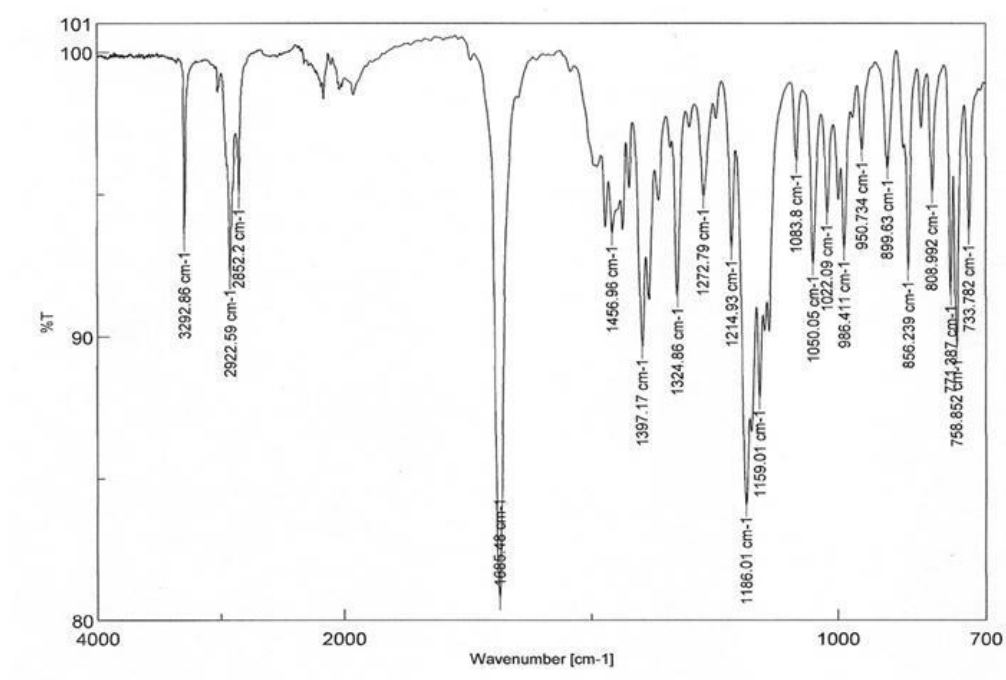
**IR**  $\nu$  = 3292, 2922, 1685, 1397, 1272, 1186, 1050 cm<sup>-1</sup>.

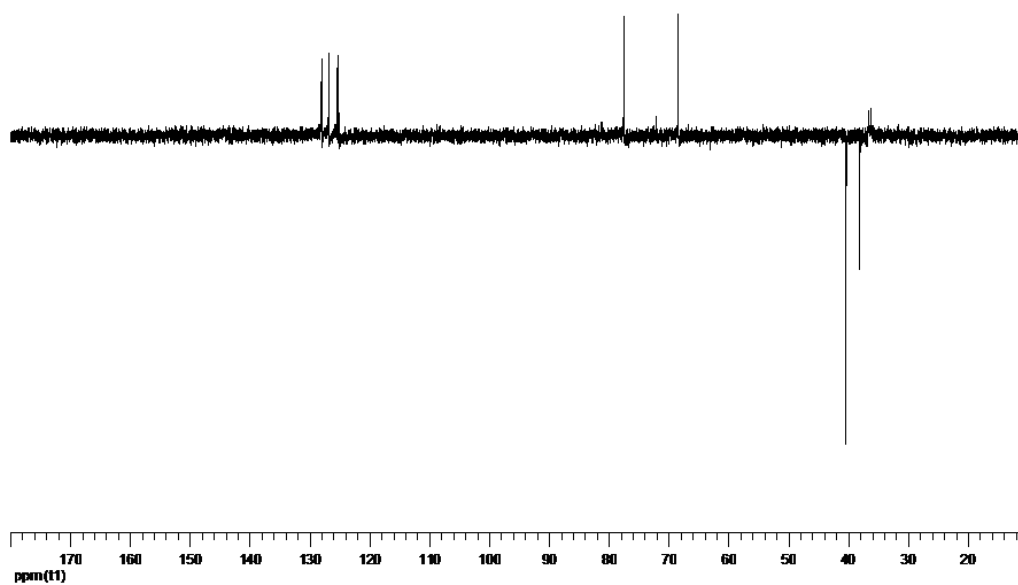
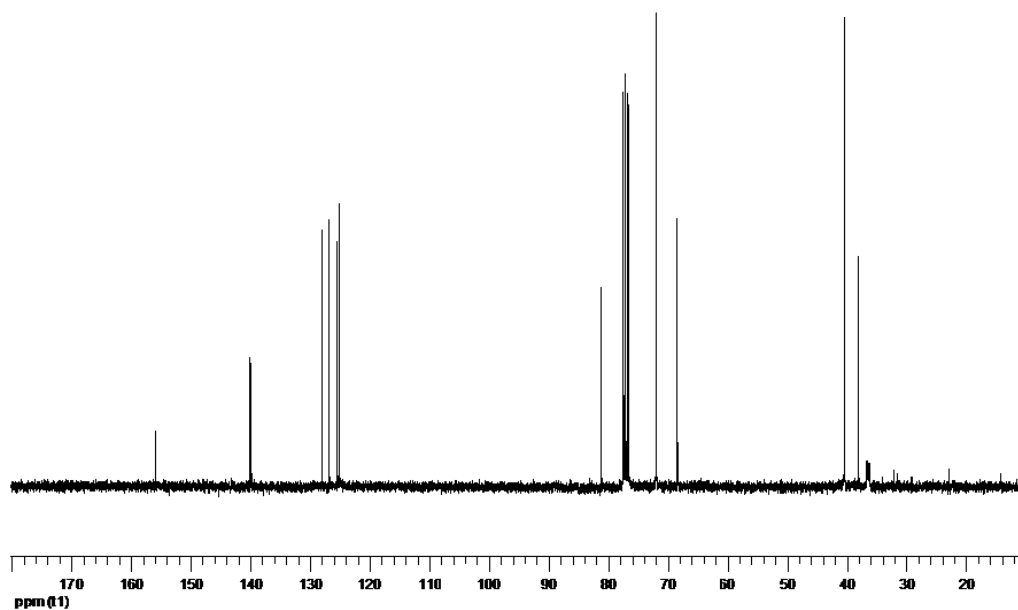
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.48 (t, 1H,  $J$  = 3.9 Hz, 7-H), 7.27-7.22 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 5.61 (dt, 1H,  $J$  = 5.6, 3.3 Hz, 2-H), 4.63-4.61 (m, 1H, 1-H), 3.67-3.66 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 3.16-2.97 (sistema AB, 1H,  $J$  = 16.8 Hz, 3 $\alpha$ -H), 3.14-2.96 (sistema AB, 1H,  $J$  = 16.8 Hz, 3 $\beta$ -H), 2.91 (m, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 2.21 (t, 2H,  $J$  = 2.2 Hz, 2 x CH).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 155.98 (CO), 140.05 (C-3a), 139.82 (C-7a), 127.96, 126.76, 125.39 y 125.10 (CH<sub>arom</sub>), 81.10 (2 x C $\equiv$ CH), 77.36 (C-2), 71.91 (2 x C $\equiv$ CH), 68.31 (C-1), 40.24 (2 x CH<sub>2</sub>), 37.94 (C-3), 36.49 y 36.14 (2 x CH<sub>3</sub>).

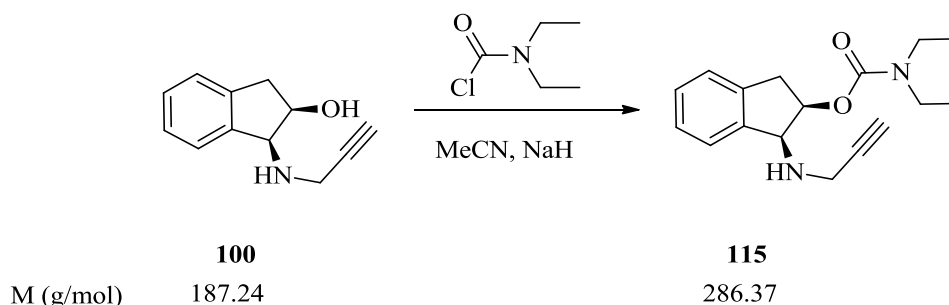
**EM (FAB): m/z (%):** 298 (19) [M+2]<sup>+</sup>, 297 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 296 (4) [M]<sup>+</sup>, 295 (9) [M-1]<sup>+</sup>, 231 (30), 204 (21), 154 (31), 137 (39).

Análisis calculado para C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (296.36): C 72.95, H 6.80, N 9.45; encontrado C 72.78, H 7.01, N 9.53.





**4.31. Dietilcarbamato de (1S,2R)-(-)-cis-1-(N-propargilamino)-2-indanilo (115).**



A partir de **100** y siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.21, por reacción con cloruro de dietilcarbamoilo y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, se ha obtenido **115** (66%), como un sólido amarillo.

**Compuesto 115:** Sólido amarillo, p.f. 68-69°C.

$[\alpha]_D^{23} = -37.6^\circ$  (23°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

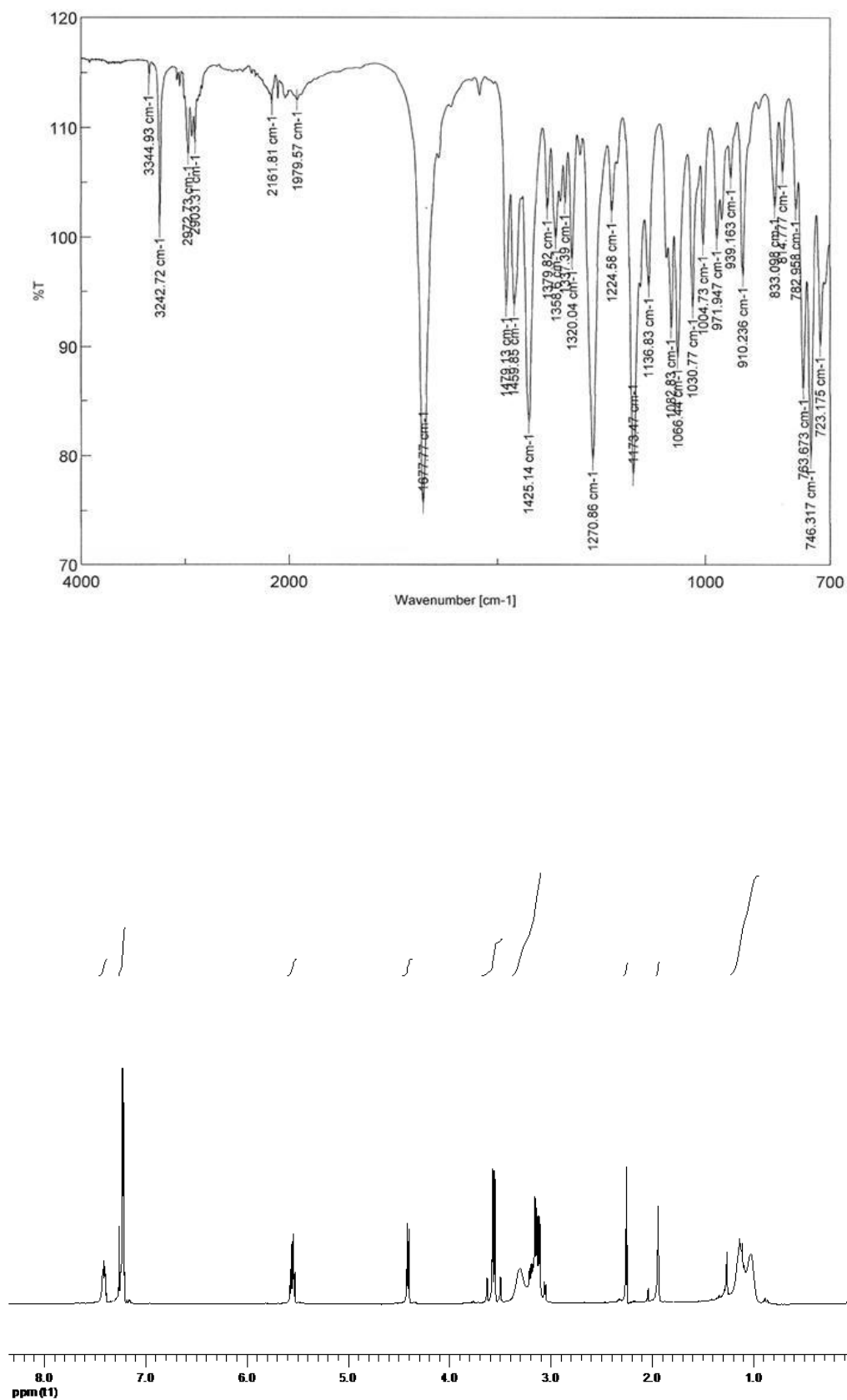
**IR**  $\nu$  = 3242, 2972, 1677, 1425, 1270, 1173, 1066 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.42-7.39 (m, 1H, 7-H), 7.29-7.21 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 5.54 (dt, 1H,  $J$  = 5.3, 3.6 Hz, 2-H), 4.41-4.39 (m, 1H, 1-H), 3.63-3.49 (sistema AB, 1H,  $J$  = 16.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.62-3.48 (sistema AB, 1H,  $J$  = 16.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.29-3.09 (m, 6H, 3 $\alpha$ -H, 3 $\beta$ -H, 2 x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.25 (t, 1H,  $J$  = 2.4 Hz, CH), 1.93 (s. an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, NH), 1.28-1.01 (m, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>).

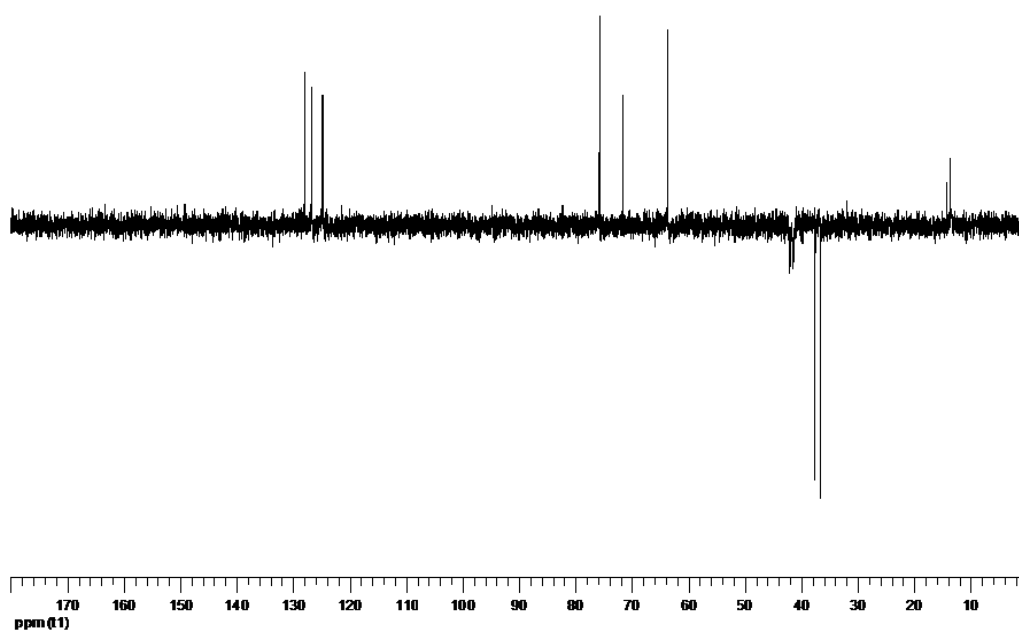
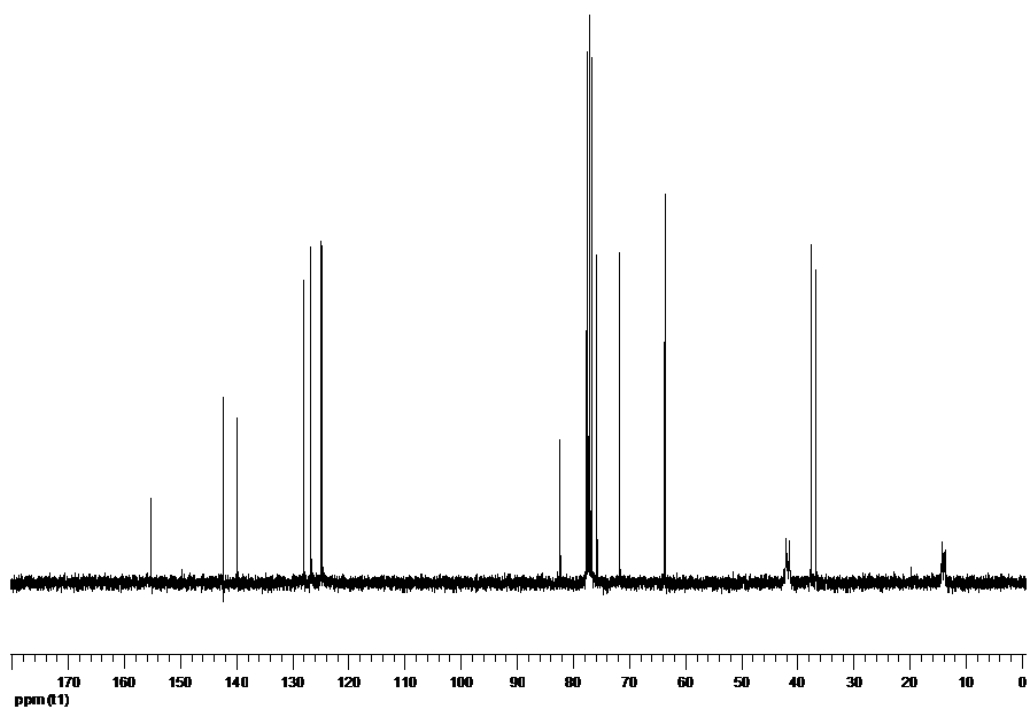
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 155.18 (CO), 142.24 (C-3a), 139.80 (C-7a), 127.91, 126.65, 124.88 y 124.61 (CH<sub>arom</sub>), 82.19 (C $\equiv$ CH), 75.64 (C-2), 71.54 (C $\equiv$ CH), 63.52 (C-1), 41.92 y 41.30 (2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 37.45 (CH<sub>2</sub>), 36.50 (C-3), 13.99 y 13.51 (2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

**EM (FAB): m/z (%)**: 288 (18) [M+2]<sup>+</sup>, 287 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 286 (8) [M]<sup>+</sup>, 285 (6) [M-1]<sup>+</sup>, 231 (21), 154 (27), 137 (26).

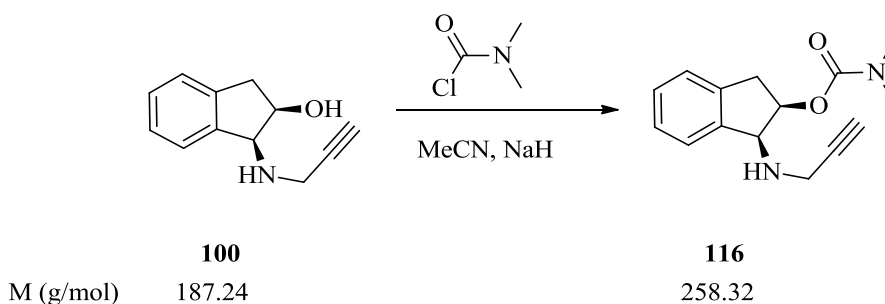
Análisis calculado para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (286.37): C 71.30, H 7.74, N 9.78; encontrado C 71.12, H 7.99, N 9.92.







**4.32. Dimetilcarbamato de (1S,2R)-(-)-cis-1-(N-propargilamino)-2-indanilo (116).**



A partir de **100** y siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.21, por reacción con cloruro de dimetilcarbamoilo y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, se ha obtenido **116** (73%), como un sólido amarillo.

**Compuesto 116:** Sólido amarillo, p.f. 119-122°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23^\circ\text{C}} = -50.4^\circ$  (23°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

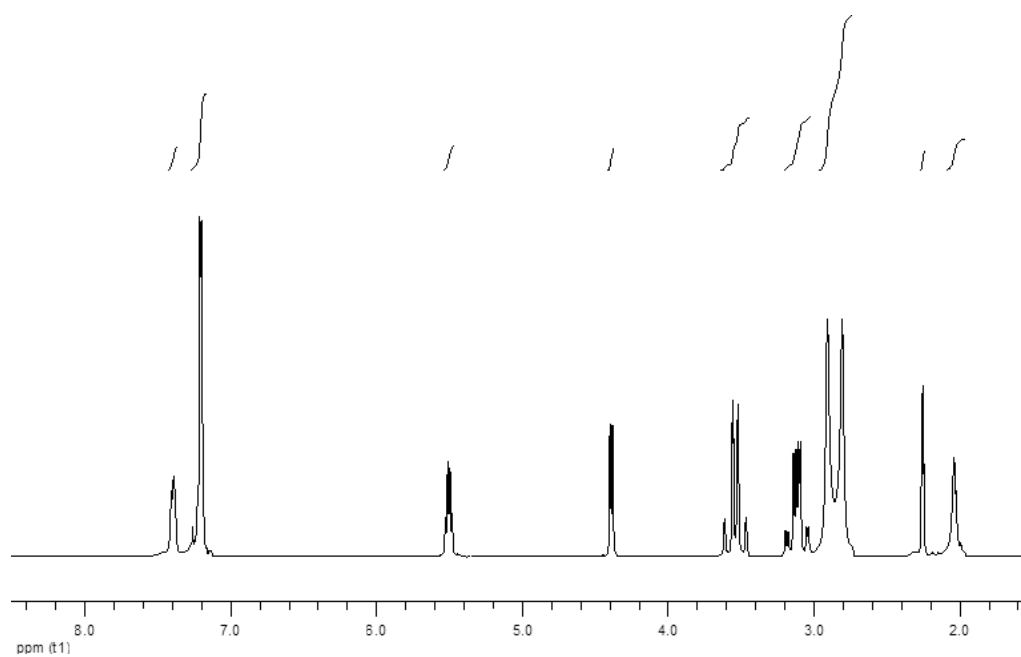
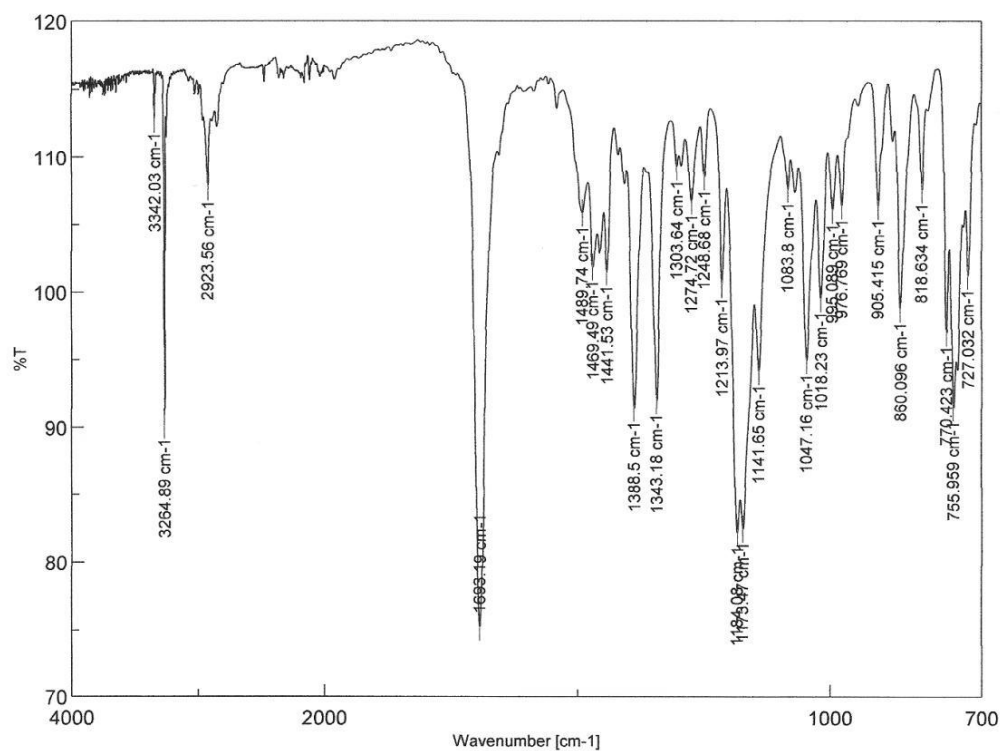
**IR**  $\nu = 3264, 2923, 1693, 1388, 1184, 1047 \text{ cm}^{-1}$ .

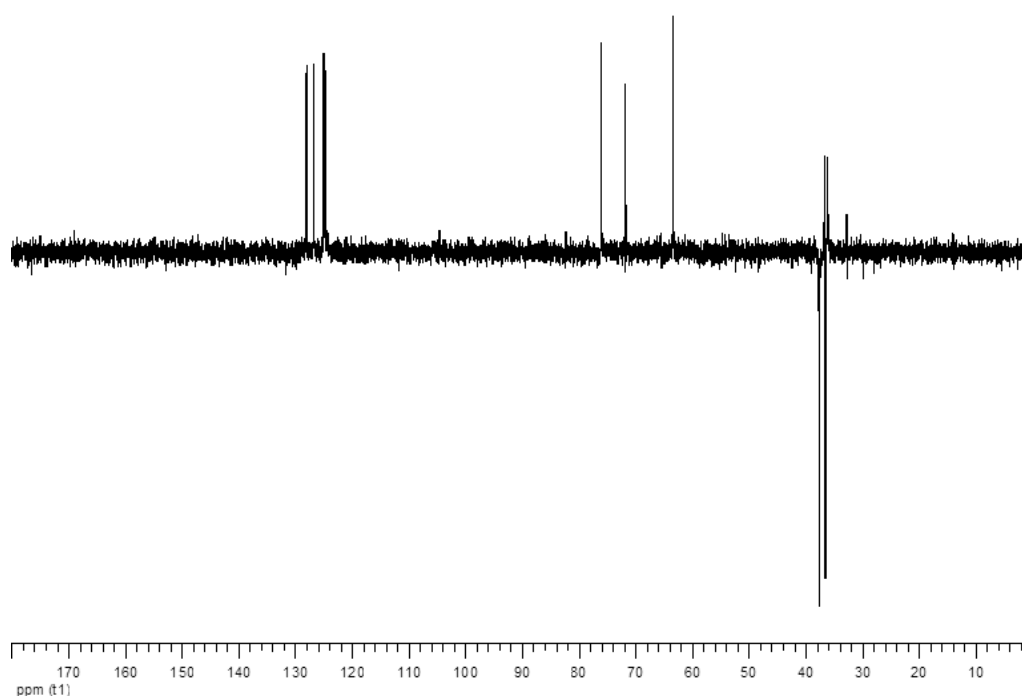
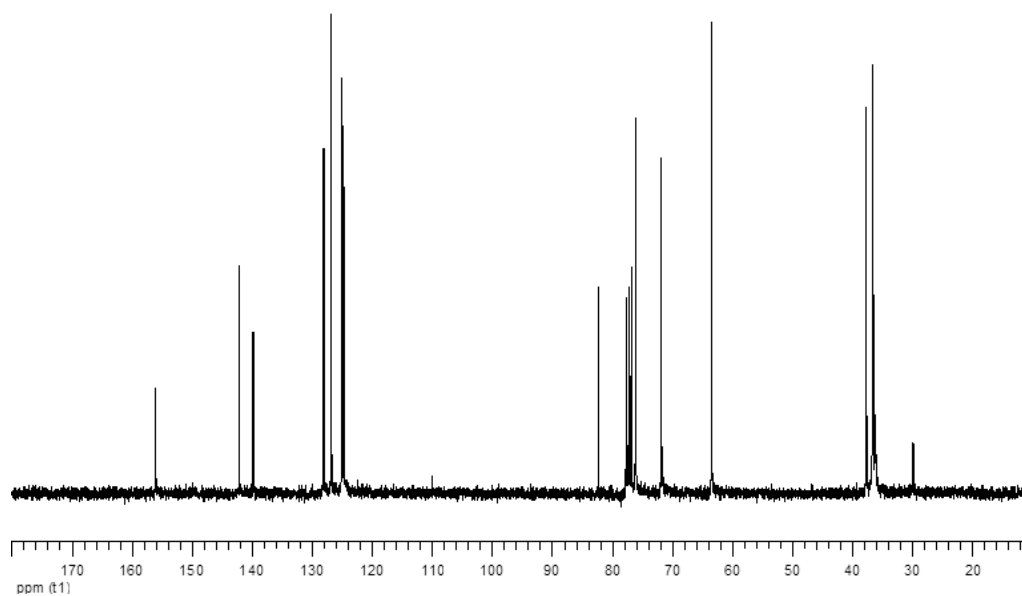
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta = 7.40\text{-}7.39$  (m, 1H, 7-H),  $7.28\text{-}7.13$  (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H),  $5.52\text{-}5.48$  (m, 1H, 2-H),  $4.38$  (d, 1H,  $J = 5.0$  Hz, 1-H),  $3.61\text{-}3.46$  (sistema AB, 1H,  $J = 16.8$  Hz, CH<sub>2</sub>),  $3.60\text{-}3.46$  (sistema AB, 1H,  $J = 16.8$  Hz, CH<sub>2</sub>),  $3.19\text{-}3.04$  (sistema AB, 1H,  $J = 16.5$  Hz, 3 $\alpha$ -H),  $3.17\text{-}3.03$  (sistema AB, 1H,  $J = 16.5$  Hz, 3 $\beta$ -H),  $2.90\text{-}2.80$  (m, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>),  $2.62$  (t, 1H,  $J = 2.5$  Hz, CH),  $2.25$  (s. an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, NH).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta = 155.97$  (CO),  $142.09$  (C-3a),  $139.75$  (C-7a),  $127.97$ ,  $126.69$ ,  $124.93$  y  $124.66$  (CH<sub>arom</sub>),  $82.17$  (C $\equiv$ CH),  $76.00$  (C-2),  $71.64$  (C $\equiv$ CH),  $63.28$  (C-1),  $37.46$  (CH<sub>2</sub>),  $36.35$  (C-3),  $29.94$  y  $29.67$  (2 x CH<sub>3</sub>).

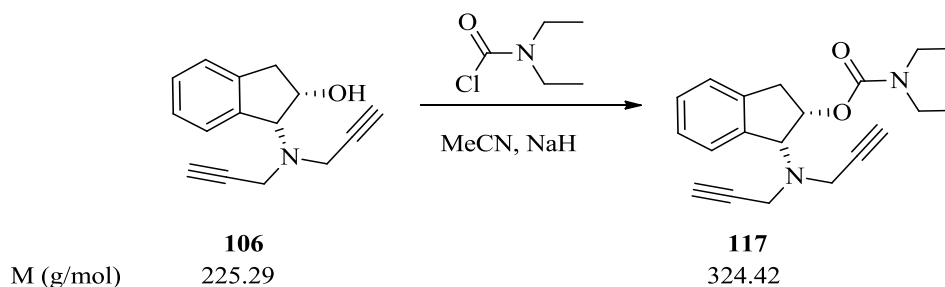
**EM (FAB): m/z (%):** 258 (1) [M]<sup>+</sup>, 257 (6) [M-1]<sup>+</sup>, 186 [(M-1), aminoalcohol]<sup>+</sup>, 168 (100), 116 (80), 72 (80).

Análisis calculado para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (258.32): C 69.74, H 7.02, N 10.84; encontrado C 69.65, H 7.13, N 10.93.





**4.33. Dietilcarbamato de (1R,2S)-(+)-cis-1-(N,N-dipropargilamino)-2-indanilo (117).**



A partir de **106** y siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.21, por reacción con cloruro de dietilcarbamoilo y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, se ha obtenido **113** (50%), como un aceite transparente.

**Compuesto 117:** Aceite transparente.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23^\circ\text{C}} = +12^\circ$  (23°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

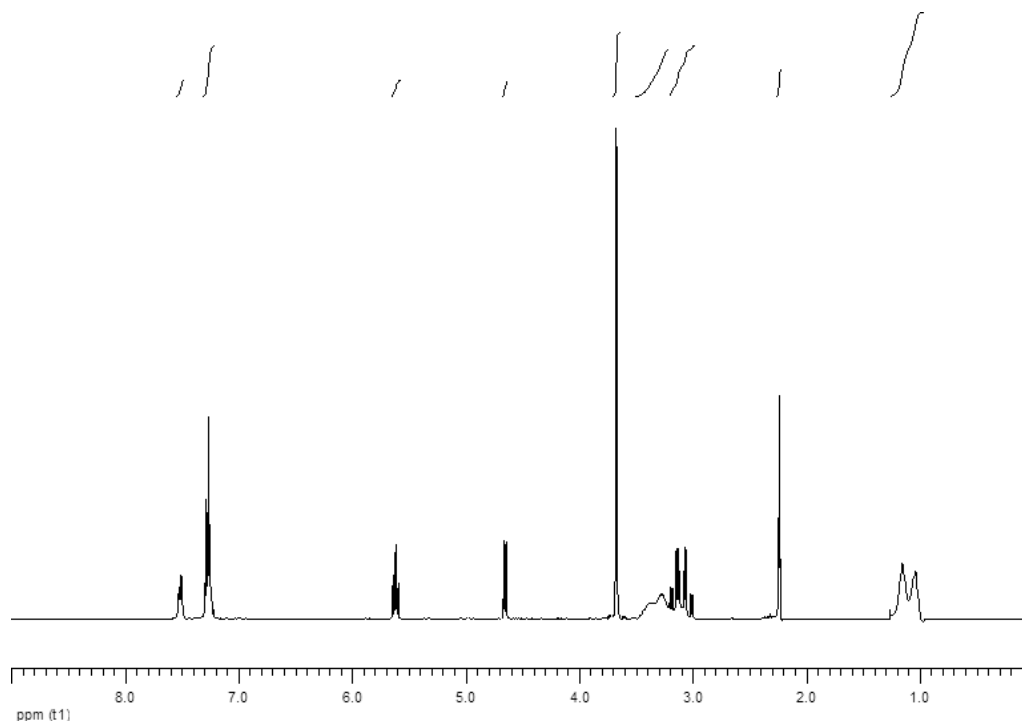
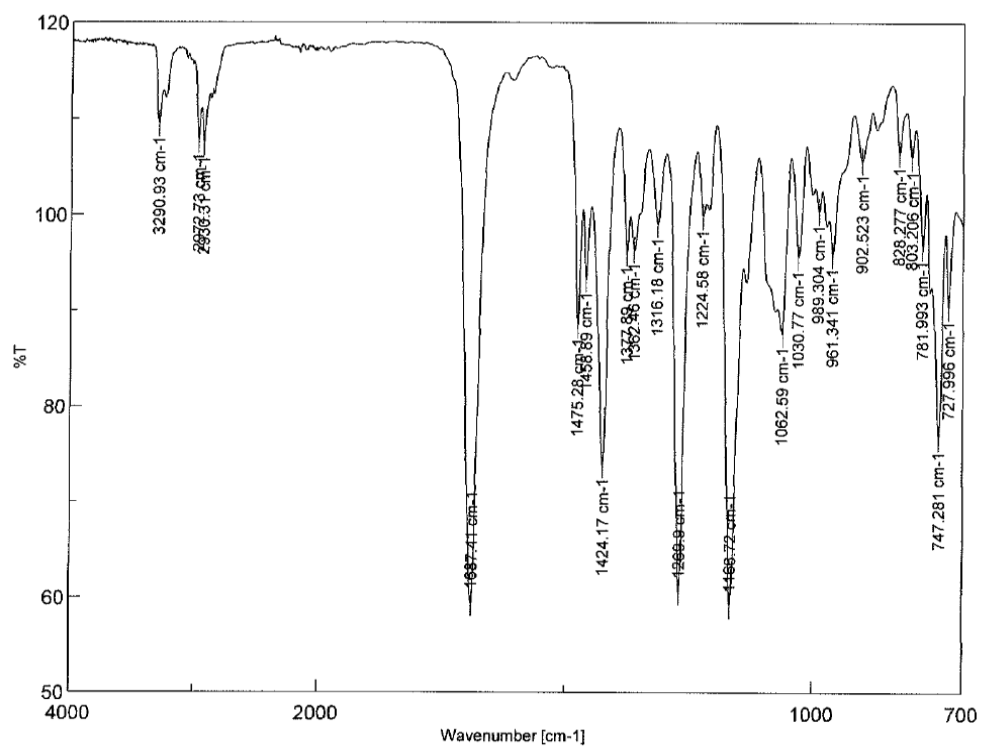
**IR v** = 3290, 2972, 1687, 1424, 1270, 1166, 1062 cm<sup>-1</sup>.

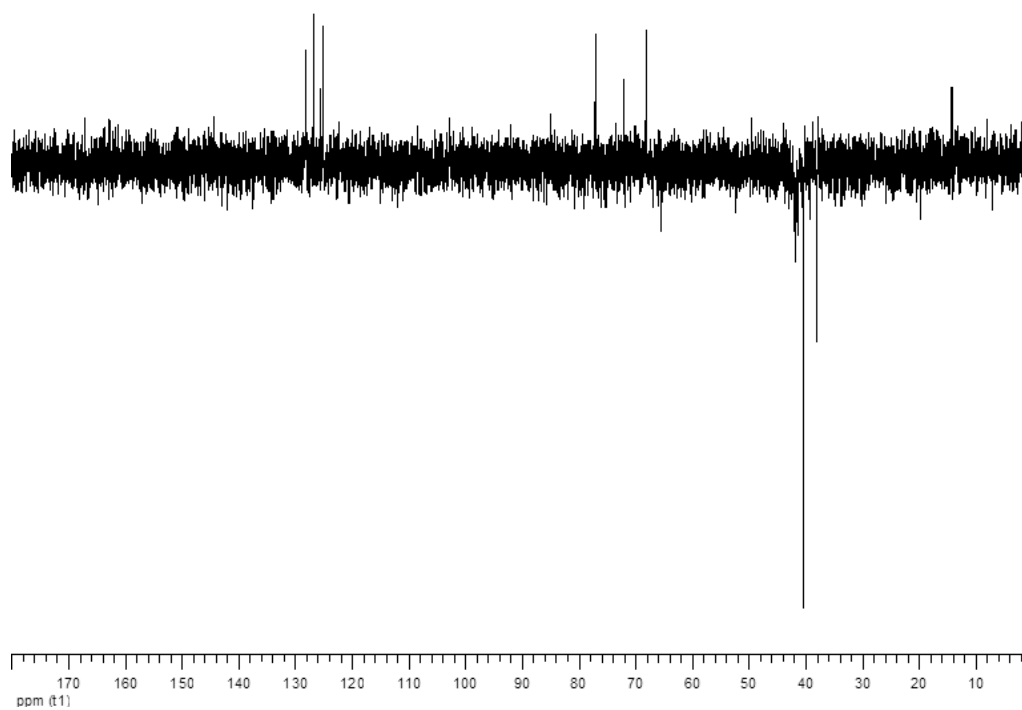
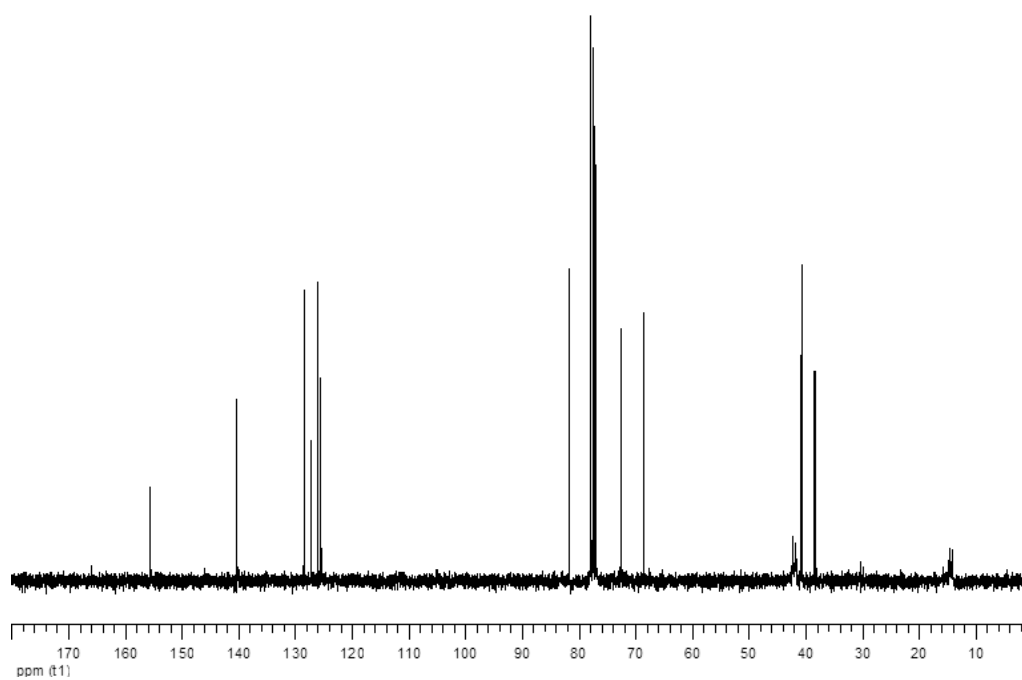
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.50-76.46 (m, 1H, 7-H), 7.28-7.20 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 5.60 (dt, 1H,  $J$  = 5.8, 3.8 Hz, 2-H), 4.63 (dd, 1H,  $J$  = 5.6, 0.8 Hz, 1-H), 3.65-3.64 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>) 3.33-3.23 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.17-2.97 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB}$  = 16.8 Hz,  $J_{AM}$  = 6.1 Hz,  $J_{BM}$  = 3.8 Hz, 3 $\alpha$ -H, 3 $\beta$ -H), 2.21 (t, 2H,  $J$  = 2.2 Hz, 2 x CH), 1.12-1.01 (m, 6H, 2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 155.24 (CO), 140.00 (C-3a), 139.87 (C-7a), 128.02, 126.74, 125.58 y 125.01 (CH<sub>arom</sub>), 81.09 (2 x C $\equiv$ CH), 76.97 (C-2), 71.98 (2 x C $\equiv$ CH), 67.98 (C-1), 41.68 y 41.17 (2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 40.16 (2 x CH<sub>2</sub>), 37.82 (C-3), 14.01 y 13.91 (2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

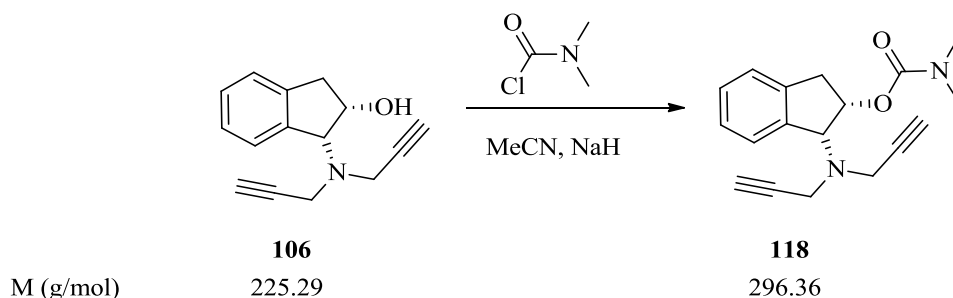
**EM (ESI): m/z (%):** 326 (26) [M+2]<sup>+</sup>, 325 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 288 (19) [M<sup>+</sup>-propargilo], 232 (8).

Análisis calculado para C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (324.42): C 74.04, H 7.46, N 8.64; encontrado C 73.92, H 7.66, N 8.69.





**4.34. Dimetilcarbamato de (1*R*,2*S*)-(+)-*cis*-1-(*N,N*-dipropargilamino)-2-indanilo (118).**



A partir de **106** y siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.21, por reacción con cloruro de dietilcarbamoilo y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, se ha obtenido **118** (54%), como un sólido blanco.

**Compuesto 118:** Sólido blanco, p.f. 107-109°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23^\circ\text{C}} = +33.4^\circ$  (23°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

**IR**  $\nu$  = 3288, 2932, 1694, 1396, 1273, 1174, 1053 cm<sup>-1</sup>.

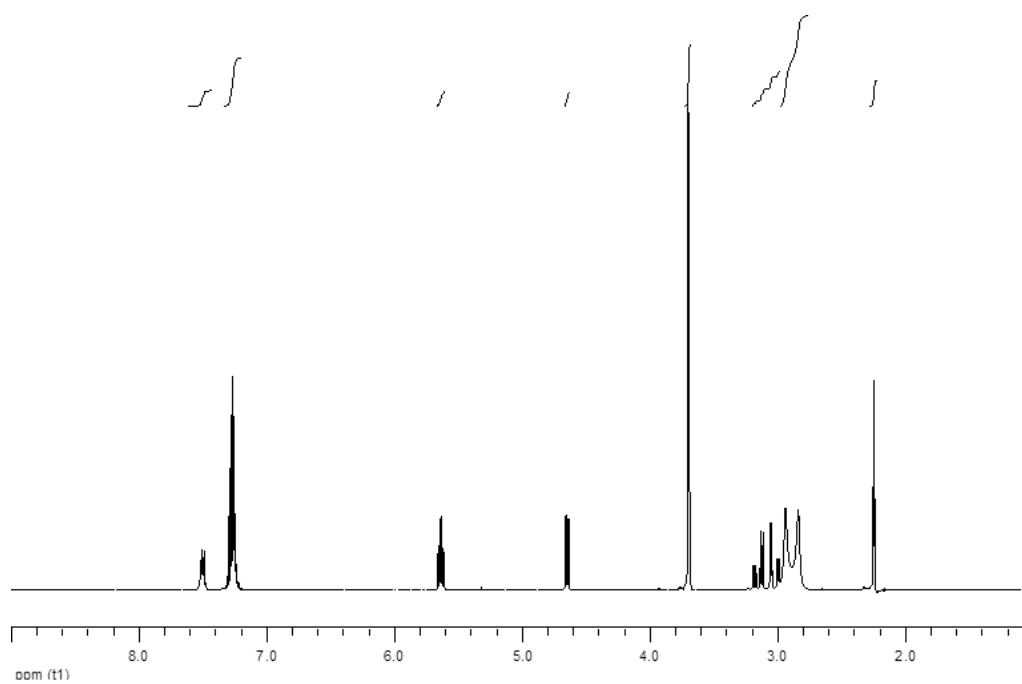
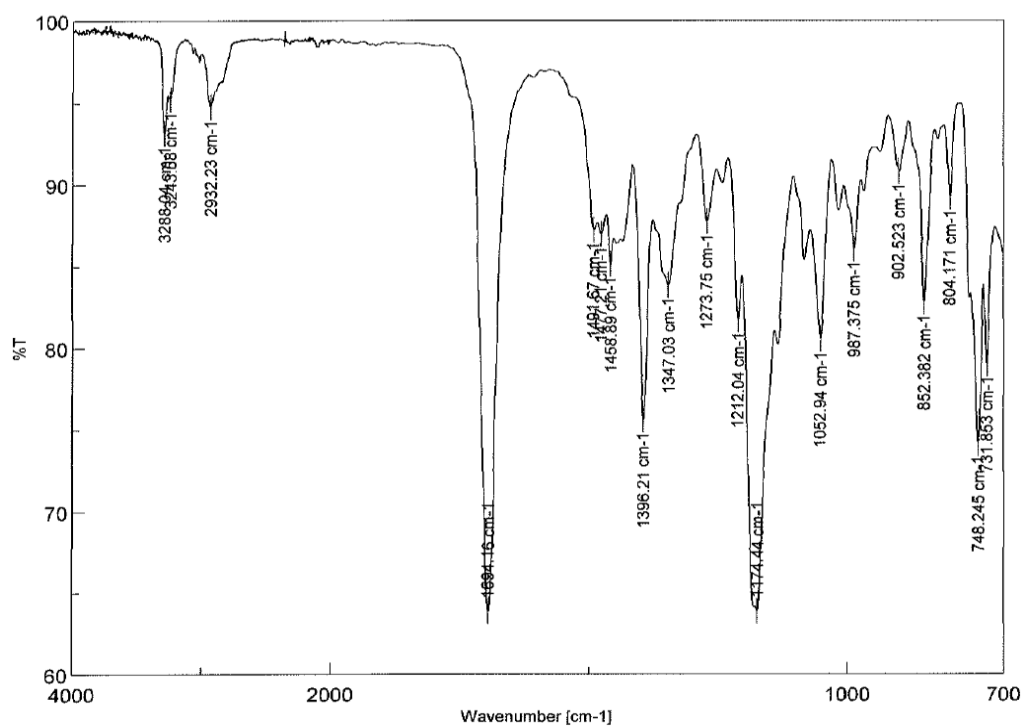
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.50-7.47 (m, 1H, 7-H), 7.28-7.20 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 5.61 (dt, 1H,  $J$  = 5.6, 3.3 Hz, 2-H), 4.62 (dd, 1H,  $J$  = 5.5, 0.8 Hz, 1-H), 3.67 (d, 4H,  $J$  = 2.4 Hz, 2 x CH<sub>2</sub>) 3.16-2.96 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB}$  = 16.8 Hz,  $J_{AM}$  = 5.8 Hz,  $J_{BM}$  = 3.3 Hz, 3 $\alpha$ -H, 3 $\beta$ -H), 2.91-2.81 (m, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 2.21 (t, 2H,  $J$  = 2.2 Hz, 2 x CH).

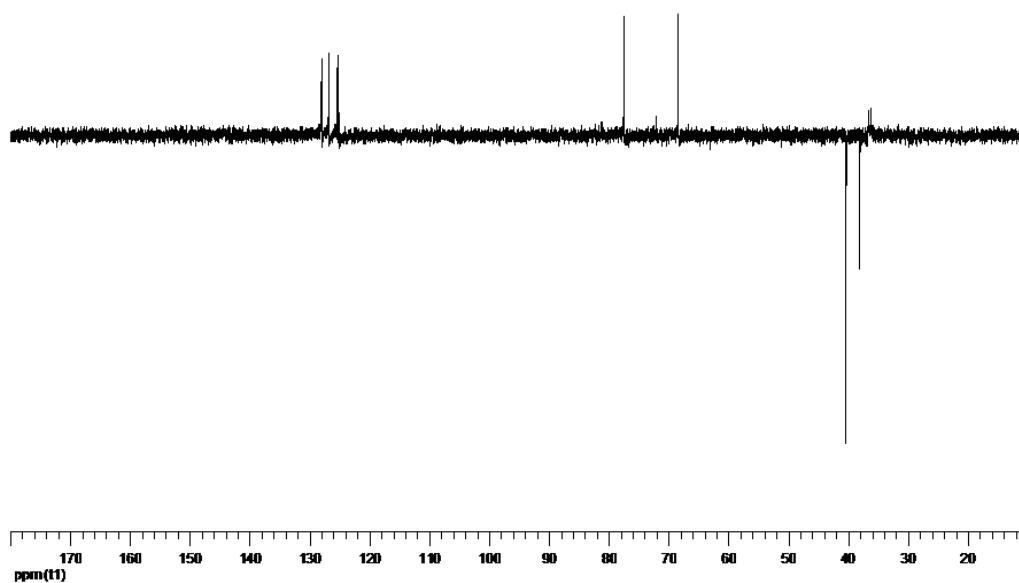
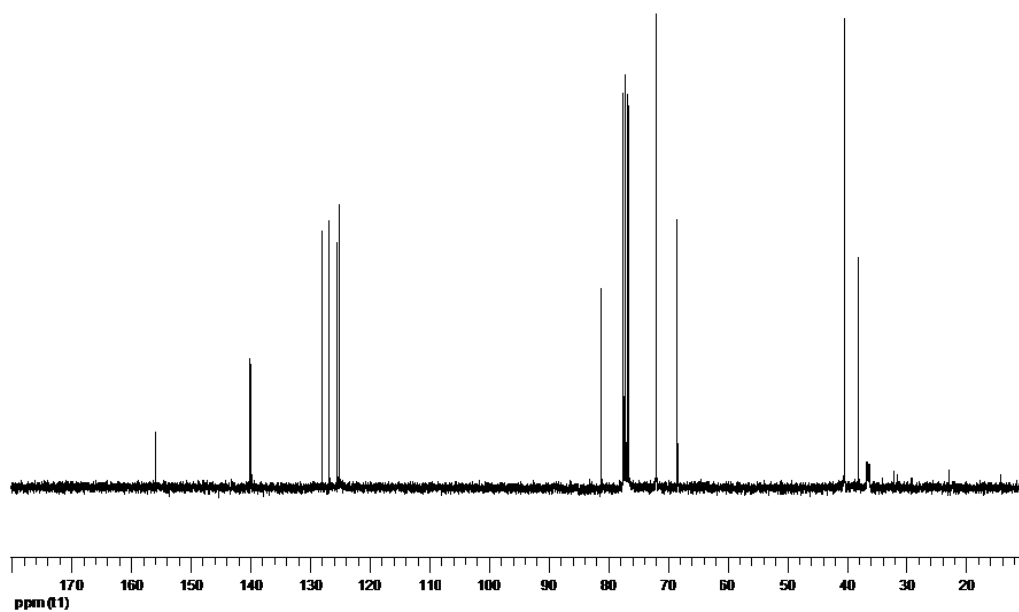
**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 155.97 (CO), 140.07 (C-3a), 139.83 (C-7a), 127.97, 126.77, 125.40 y 125.11 (CH<sub>arom</sub>), 81.12 (2 x C $\equiv$ CH), 77.36 (C-2), 71.92 (2 x C $\equiv$ CH), 68.31 (C-1), 40.24 (2 x CH<sub>2</sub>), 37.95 (C-3), 36.89 y 36.49 (2 x CH<sub>3</sub>).

**EM (ESI): m/z (%):** 298 (28) [M+2]<sup>+</sup>, 297 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 204 (31).

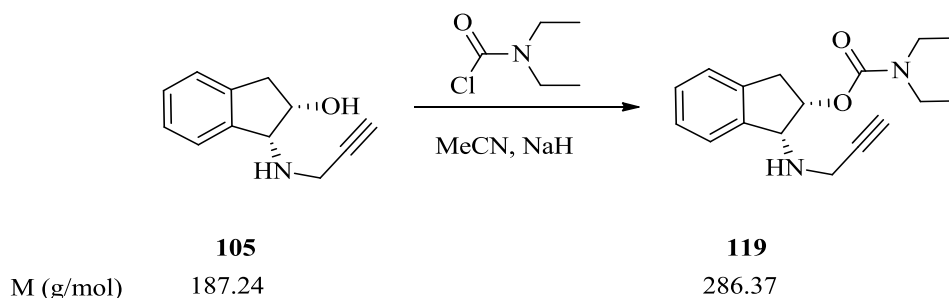
Análisis calculado para C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (296.36): C 72.95, H 6.80, N 9.45; encontrado C 72.83, H 6.98, N 9.49.







**4.35. Dietilcarbamato de (1*R*,2*S*)-(+)-*cis*-1-(*N*-propargilamino)-2-indanilo (119).**



A partir de **105** y siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.21, por reacción con cloruro de dietilcarbamoilo y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, se ha obtenido **119** (48%), como un aceite amarillo.

**Compuesto 119:** Aceite amarillo.

$[\alpha]_D^{24^\circ\text{C}} = +23.6^\circ$  (24°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

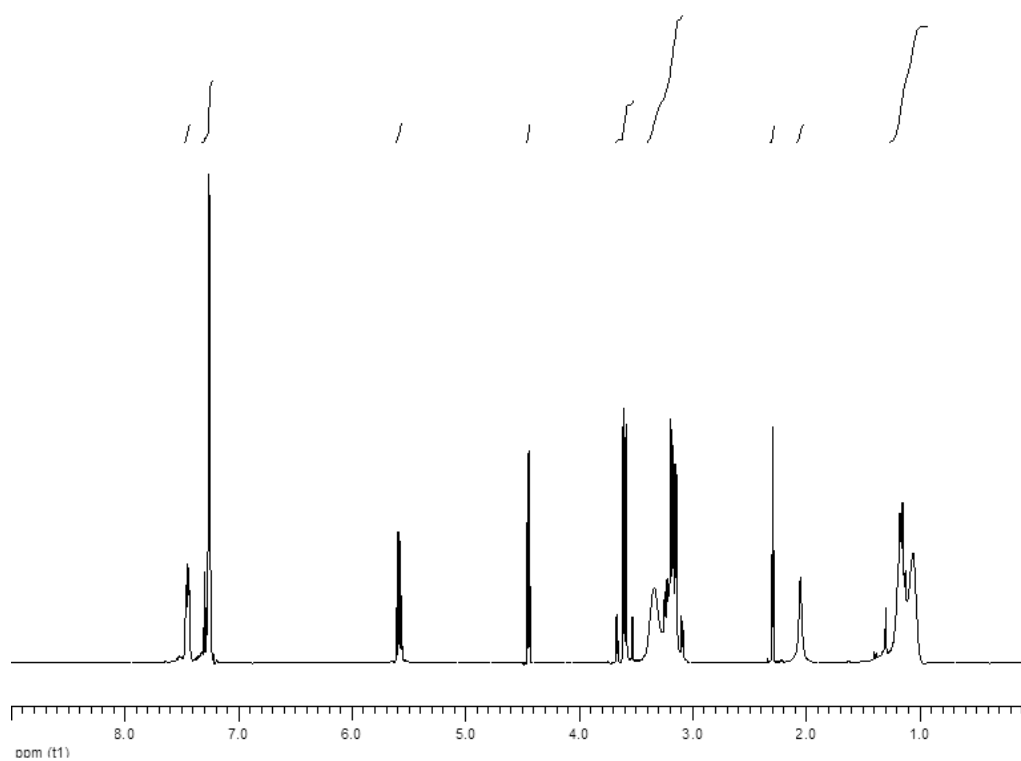
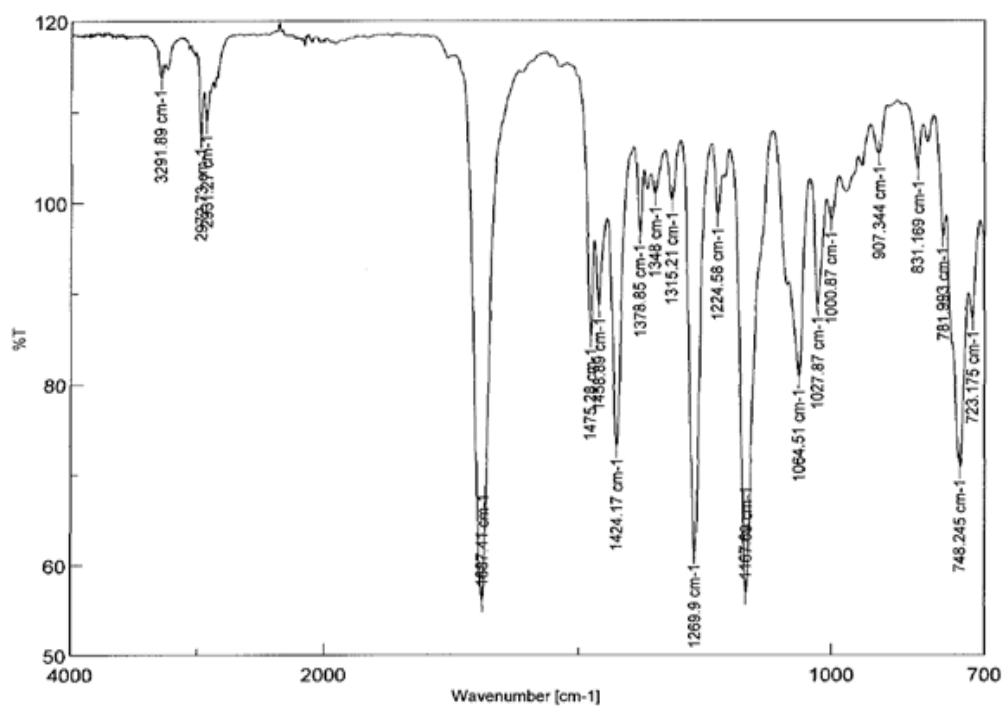
**IR**  $\nu$  = 3291, 2972, 1687, 1424, 1269, 1167, 1064 cm<sup>-1</sup>.

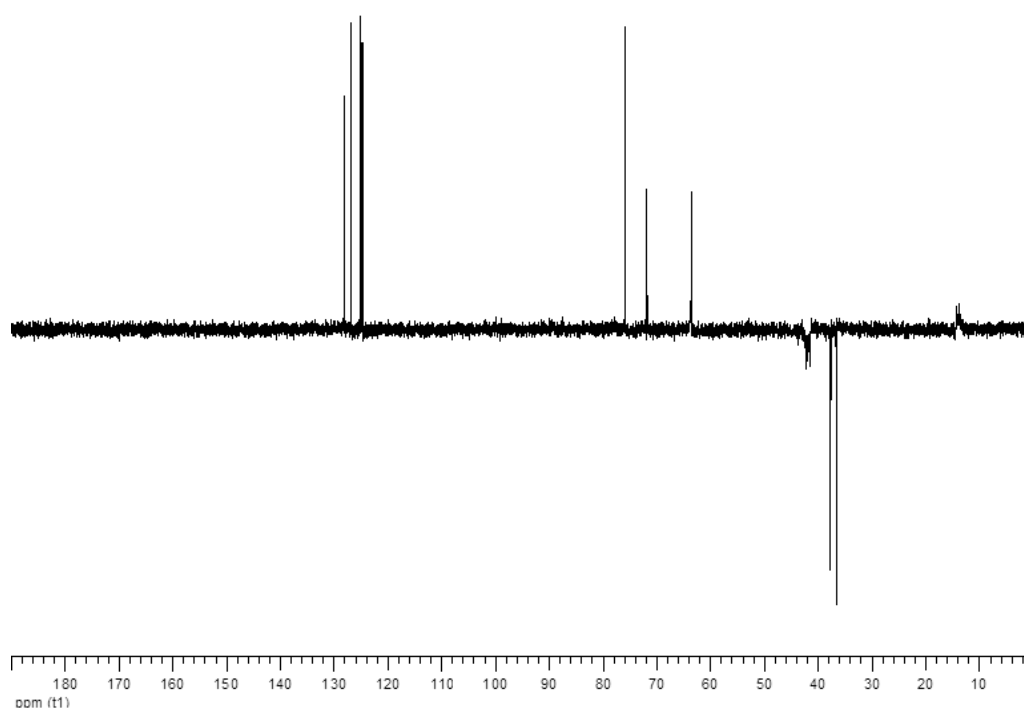
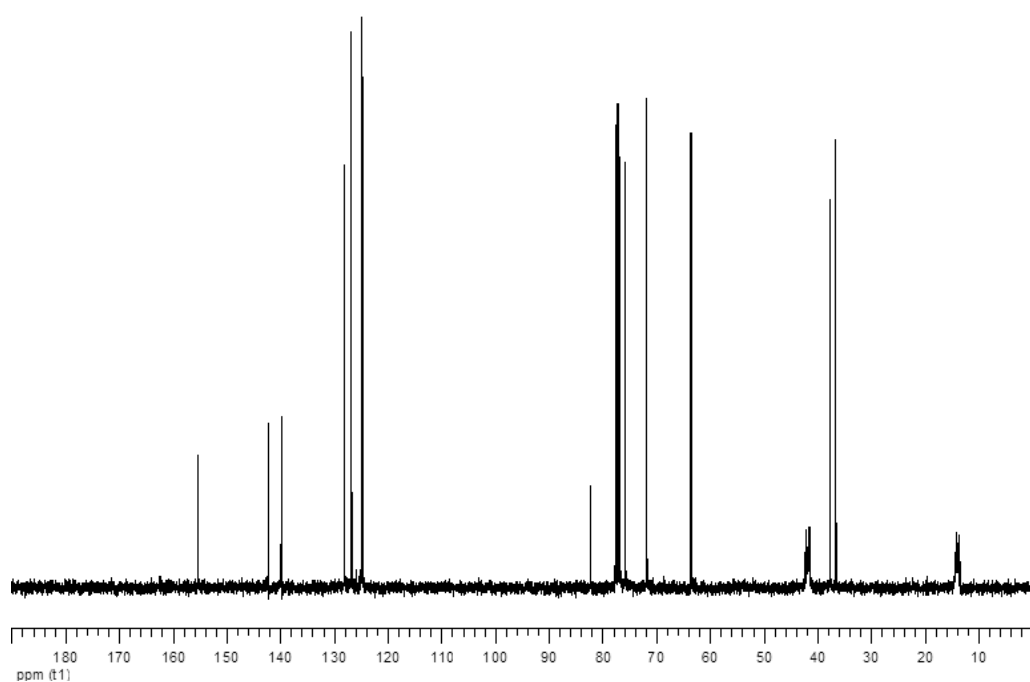
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.42-7.40 (m, 1H, 7-H), 7.29-7.19 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 5.57-5.53 (m, 1H, 2-H), 4.41 (d, 1H,  $J$  = 5.0 Hz, 1-H), 3.63-3.50 (sistema AB, 1H,  $J$  = 16.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.62-3.49 (sistema AB, 1H,  $J$  = 16.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.29-3.05 (m, 6H, 3 $\alpha$ -H, 3 $\beta$ -H, 2 x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.26-2.24 (m, 1H, CH), 2.00 (s. an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, NH), 1.13-1.01 (m, 6H, 2 x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 155.21 (CO), 142.18 (C-3a), 139.80 (C-7a), 127.94, 126.68, 124.89 y 124.62 (CH<sub>arom</sub>), 82.12 (C $\equiv$ CH), 75.67 (C-2), 71.63 (C $\equiv$ CH), 63.40 (C-1), 41.90 y 41.32 (2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 37.43 (CH<sub>2</sub>), 36.38 (C-3), 13.97 y 13.51 (2 x CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

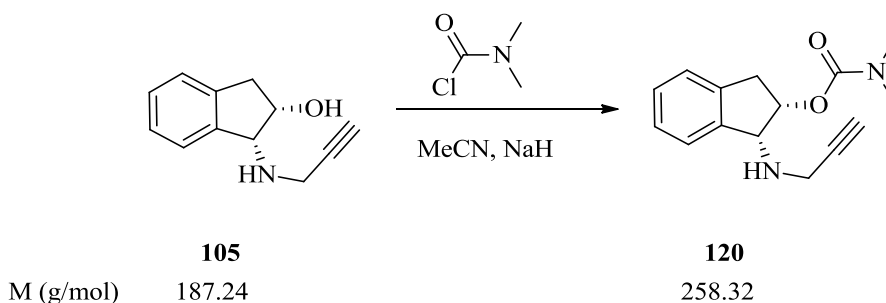
**EM (ESI): m/z (%):** 289 (1) [M+3]<sup>+</sup>, 288 (26) [M+2]<sup>+</sup>, 287 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 232 (13) [M<sup>+</sup>-propargilamino].

Análisis calculado para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (286.37): C 71.30, H 7.74, N 9.78; encontrado C 71.11, H 7.98, N 9.87.





**4.36. Dimetilcarbamato de (1*R*,2*S*)-(+)-*cis*-1-(*N*-propargilamino)-2-indanilo (120).**



A partir de **105** y siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.21, por reacción con cloruro de dietilcarbamoilo y NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) en MeCN, se ha obtenido **120** (41%), como un sólido blanco.

**Compuesto 120:** Sólido blanco, p.f. 115-117°C.

$[\alpha]_D^{24} = +27.6^\circ$  (24°C, 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

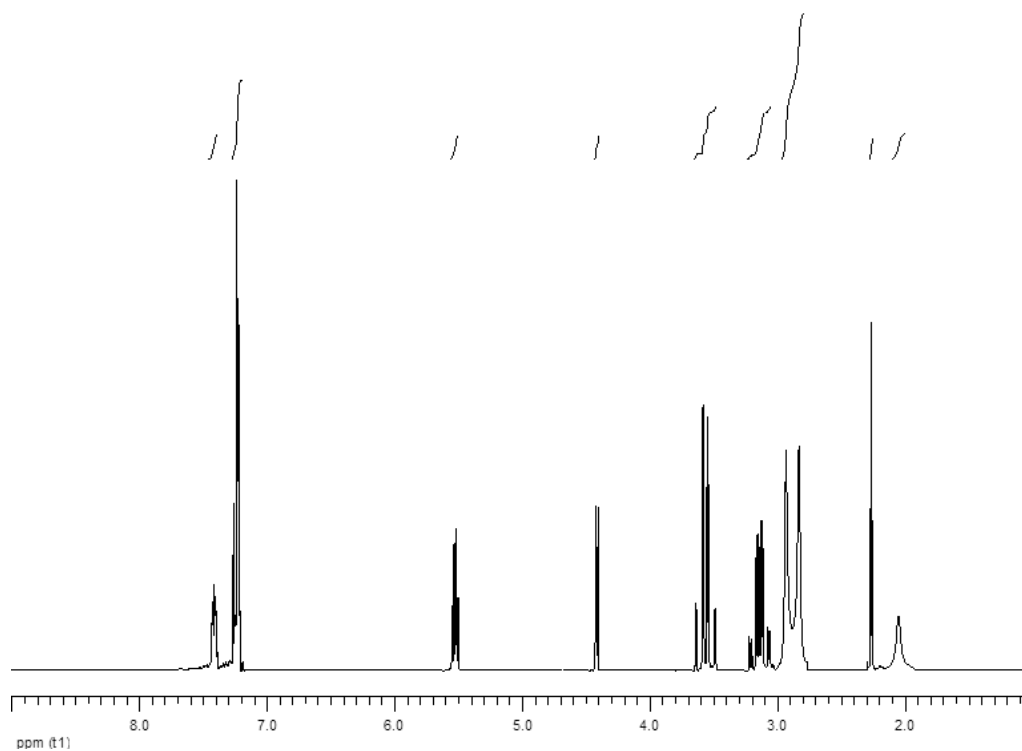
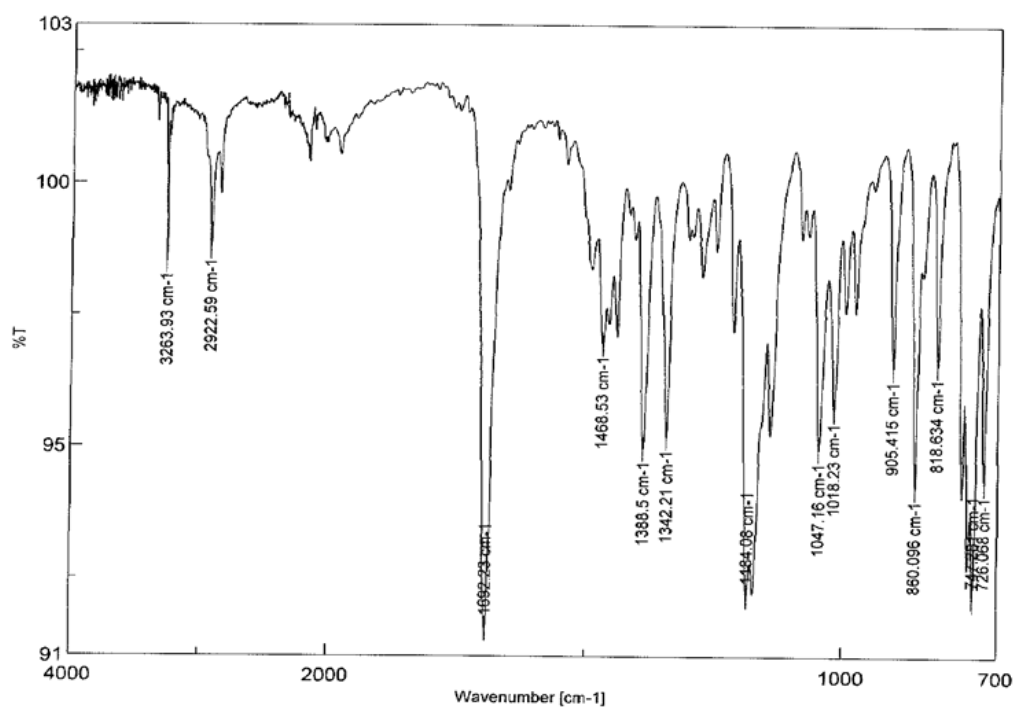
**IR**  $\nu$  = 3262, 2922, 1692, 1388, 1184, 1047 cm<sup>-1</sup>.

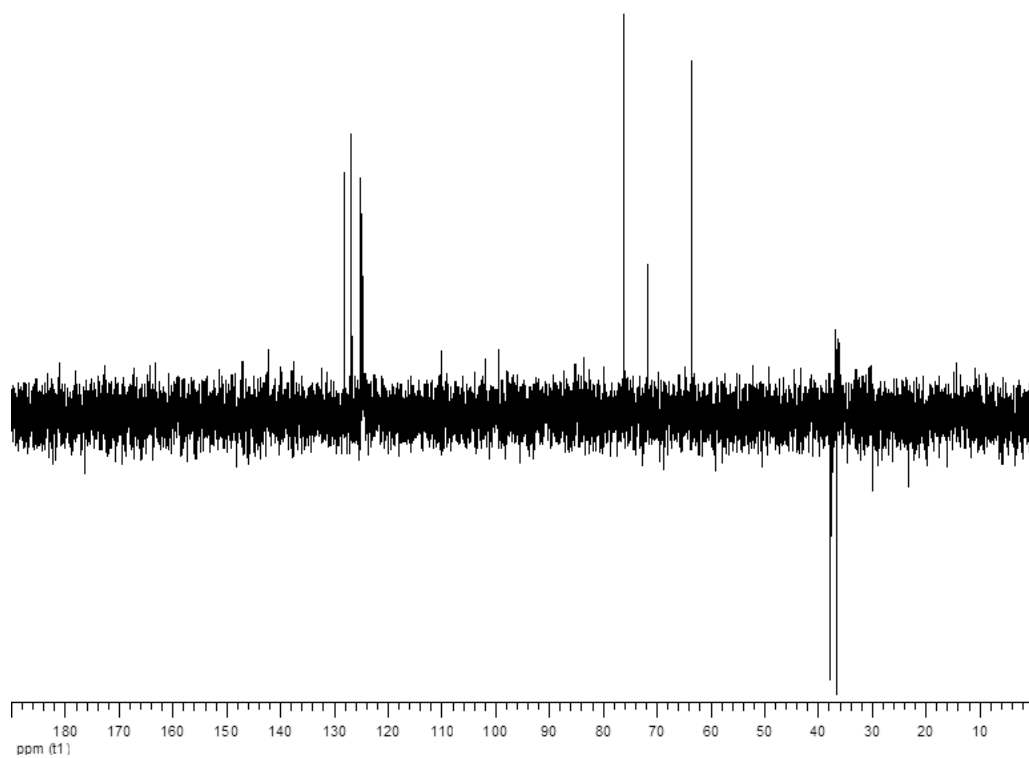
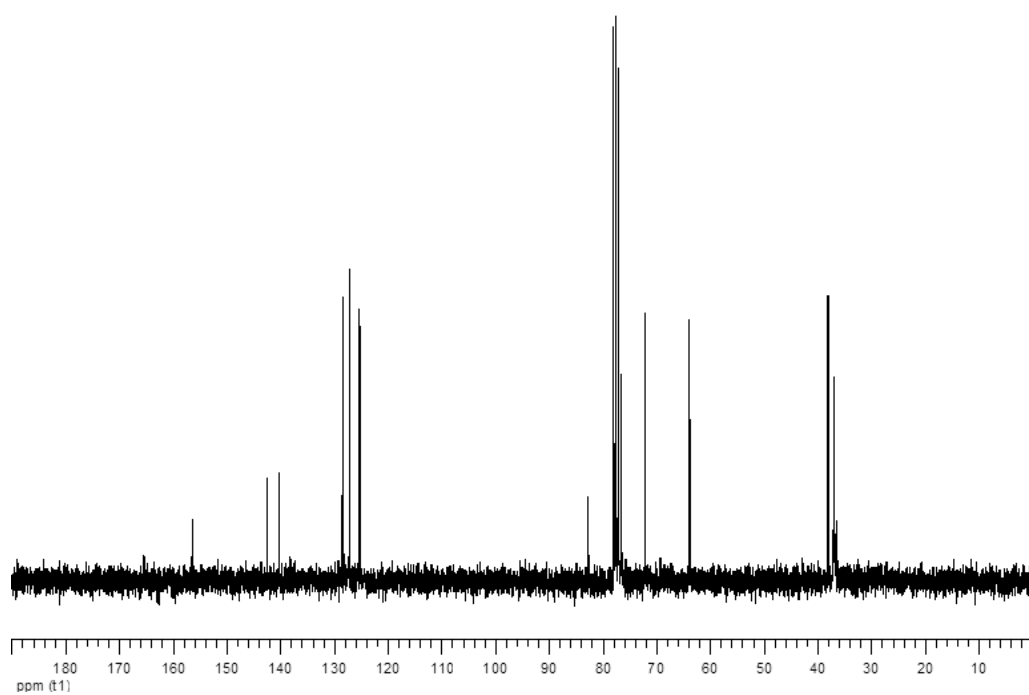
**<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.43-7.39 (m, 1H, 7-H), 7.29-7.19 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 5.52 (dt, 1H,  $J$  = 5.3, 3.6 Hz, 2-H), 4.41 (d, 1H,  $J$  = 4.7 Hz, 1-H), 3.64-3.49 (sistema AB, 1H,  $J$  = 16.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.63-3.48 (sistema AB, 2H,  $J$  = 16.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.21-3.05 (parte AB de un sistema ABM, 2H,  $J_{AB}$  = 16.5 Hz,  $J_{AM}$  = 5.5 Hz,  $J_{BM}$  = 3.8 Hz, 3 $\alpha$ -H, 3 $\beta$ -H), 2.92-2.82 (m, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 2.25 (t, 1H,  $J$  = 2.5 Hz, CH), 2.04 (s. an., 1H, intercambia con D<sub>2</sub>O, NH).

**<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 156.00 (CO), 142.09 (C-3a), 139.77 (C-7a), 127.99, 126.71, 124.95 y 124.68 (CH<sub>arom</sub>), 82.15 (C $\equiv$ CH), 76.00 (C-2), 71.62 (C $\equiv$ CH), 63.28 (C-1), 37.48 (CH<sub>2</sub>), 36.88 (CH<sub>3</sub>), 36.34 (C-3) y 36.35 (CH<sub>3</sub>) y.

**EM (ESI): m/z (%):** 260 (6) [M+2]<sup>+</sup>, 259 (6100) [M+1]<sup>+</sup>, 204 (16) [M<sup>+</sup>-propargilamino].

Análisis calculado para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (258.32): C 69.74, H 7.02, N 10.84; encontrado C 69.62, H 7.14, N 10.96.







## ***5. ENSAYOS BIOLÓGICOS***



## 5. ENSAYOS BIOLÓGICOS

Los ensayos farmacológicos necesarios para determinar la actividad biológica de los diferentes análogos de rasagilina y ladostigilo preparados fueron realizados en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Santiago de Compostela, por la Dra. Matilde Yáñez.

### 5.1. ACTIVIDAD INHIBITORIA FRENTE A MAO-A Y MAO-B.

En primer lugar, la mayoría de los compuestos preparados fueron sometidos a un proceso inicial de evaluación farmacológica, al objeto de conocer la capacidad inhibitoria que presentan frente a la MAO-A y MAO-B.

Esta capacidad inhibitoria fue determinada a través de la medición de sus efectos sobre la producción de peróxido de hidrógeno a partir de *p*-tiramina (un sustrato habitual para las dos isoenzimas de la hMAO), usando 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina como reactivo y las isoformas de la MAO presentes en la fracción microsomal preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus recombinantes que contienen insertos de cADN de hMAO-A y hMAO-B.<sup>178,179</sup>

La detección de la producción de peróxido de hidrógeno puede ser llevada a cabo utilizando el reactivo mencionado anteriormente el cual es una sonda no fluorescente, altamente sensible y estable que reacciona con el peróxido de hidrógeno en presencia de *peroxidasa* de rábano para producir un producto fluorescente, la resurfina.<sup>180</sup>

Los análogos evaluados inhibieron el control enzimático de la actividad de MAO, siendo esta inhibición concentración-dependiente y no reaccionaron directamente con 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina, lo cual indica que estos compuestos no interfieren con las mediciones. Los valores correspondientes de IC<sub>50</sub> y los ratios de selectividad de MAO-B [IC<sub>50</sub> (MAO-A)] / [IC<sub>50</sub> (MAO-B)] se muestran en la **Tabla 10**.

Los compuestos ensayados fueron **91a, 91b, 92a, 92b, 93a, 93b, 94a, 97, 98, 100, 101, 102, 103, 109a, 109b, 110a, 110b, 111a, 113, 114 y 115**. De todos ellos solamente los compuestos **92a, 92b y 97** mostraron una cierta capacidad inhibitoria y selectiva frente a la MAO-B.

---

<sup>178</sup> Santana, L.; González-Díaz, H.; Quezada, E.; Uriarte, E.; Yáñez, M.; Viña, D.; Orallo, F. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (21), 6740.

<sup>179</sup> Santana, L.; Uriarte, E.; González-Díaz, H.; Zagotto, G.; Soto-Otero, R.; Méndez-Álvarez, E. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (3), 1149.

<sup>180</sup> Yáñez, M.; Fraiz, N.; Cano, E.; Orallo, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *344* (2), 688.

**Tabla 10. Actividad inhibitoria de los compuestos ensayados frente a las isoformas humanas recombinadas de MAO, expresadas en células de insectos (BTI) infectadas con baculovirus.**

Compuesto	MAO-A (IC <sub>50</sub> )	MAO-B (IC <sub>50</sub> )	Ratio
<b>91a</b>	**	**	
<b>91b</b>	**	**	
<b>97</b>	***	926.49 ± 49.60 nM	>108 <sup>b</sup>
<b>92a</b>	**	11.38 ± 0.77 μM	>8.8 <sup>b</sup>
<b>92b</b>	**	1.49 ± 0.04 μM	>67 <sup>b</sup>
<b>98</b>	**	**	
<b>93a</b>	**	**	
<b>93b</b>	**	**	
<b>94a</b>	**	**	
<b>100</b>	**	**	
<b>101</b>	**	**	
<b>102</b>	**	**	
<b>103</b>	**	**	
<b>111a</b>	**	**	
<b>110a</b>	**	**	
<b>110b</b>	**	**	
<b>109a</b>	**	**	
<b>109b</b>	**	**	
<b>115</b>	**	**	

### Ensayos biológicos

Compuesto	MAO-A (IC <sub>50</sub> )	MAO-B (IC <sub>50</sub> )	Ratio
<b>114</b>	**	**	
<b>113</b>	**	**	
<b>Clorgilina</b>	4.46 ± 0.32 nM <sup>a</sup>	61.35 ± 1.13 μM	0.000073
<b>R-(-)-deprenilo</b>	67.25 ± 1.02 μM <sup>a</sup>	19.60 ± 0.86 nM	3,431
<b>Iproniazida</b>	6.56 ± 0.76 μM	7.54 ± 0.36 μM	0.87
<b>Moclobemida</b>	361.38 ± 19.37 μM	*	<0.36 <sup>c</sup>
<b>Rasagilina</b>	16.44 ± 0.85 μM <sup>a</sup>	68.96 ± 3.63 ηM	238

\* Inactivo a 1mM (concentración más alta testada).

\*\* Inactivos a 100 μM (concentración más alta testada).

\*\*\* 100 μM inhibe la correspondiente actividad de MAO en aproximadamente un 40-45%. A altas concentraciones los compuestos precipitan.

Cada valor de IC<sub>50</sub> es la media ± el error estándar medio para cinco experimentos. El nivel de significancia estadística: <sup>a</sup>P < 0.01 en comparación con los correspondientes valores de IC<sub>50</sub> frente a MAOB, según lo determinado por ANOVA/ Dunnett's.

<sup>b</sup> Los valores obtenidos bajo el supuesto de que el IC<sub>50</sub> correspondiente frente a MAO-A es la concentración más alta probada (100 μM).

<sup>c</sup> Los valores obtenidos bajo el supuesto de que el IC<sub>50</sub> correspondiente frente a MAO-B es la concentración más alta probada (1 mM).

## 5.2. ACTIVIDAD INHIBITORIA FRENTE A COLINESTERASAS

En segundo lugar, parte de los compuestos preparados sufrieron un proceso de evaluación biológica al objeto de conocer la capacidad inhibitoria frente a *butiril* y *acetilcolinesterasa*.

El método de Ellman<sup>181</sup> para la determinación de tioles es muy utilizado para la cuantificación de la actividad de las *colinesterasas*, usando ésteres de tiocolina como sustratos.

Esta actividad es medida indirectamente por la cuantificación de la concentración del ión del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) formado en la reacción entre el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y la tiocolina,<sup>182</sup> un producto generado por la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina yodada para la determinación de la actividad de la *acetilcolinesterasa* y butiriltiocolina yodada para la determinación de la actividad de la *butirilcolinesterasa*.

Lo que se observa es un incremento en la absorbancia a 412 nm debido al color amarillo producido por la reacción entre la tiocolina yodada correspondiente y el ión ditiobisnitrobenzoato (DTNB).

Los ensayos fueron llevados a cabo frente a *acetilcolinesterasa* de eritrocitos humanos (hAChE), *acetilcolinesterasa* recombinada expresada en células HEK 293 (rhAChE) y *butirilcolinesterasa* de suero humano (hBuChE).

Todos los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados fueron expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (**Tabla 11**).

Fueron ensayados los compuestos **93b**, **94a**, **94b**, **97**, **98**, **103**, **109a**, **109b**, **110a**, **110b**, **111a**, **113** y **115**. De todos ellos, los únicos compuestos que presentaron cierta actividad inhibitoria fueron **93a** y **93b**, los cuales resultaron ser activos frente a la *acetilcolinesterasa* recombinada y *butirilcolinesterasa* para el caso del compuesto **93a** con unos valores de  $40.6 \pm 5.7 \mu\text{M}$  y  $47.0 \pm 4 \mu\text{M}$ , respectivamente, y frente a la *butirilcolinesterasa* en el caso del compuesto **93b** con un valor de  $13.5 \pm 1.3 \mu\text{M}$ .

---

<sup>181</sup> Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. Jr. Feather-Stone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88.

<sup>182</sup> Sinko, G.; Calic, M.; Bosak, A.; Zovarik, Z. *Anal. Biochem.* **2007**, 370, 223.

**Tabla 11. Actividad inhibitoria de los compuestos ensayados frente a acetilcolinesterasa de eritrocitos humanos (hAChE), acetilcolinesterasa recombinada expresada en células HEK 293 (rhAChE) y butirilcolinesterasa de suero humano (hBuChE).**

Compuesto	hAChE (IC <sub>50</sub> )	rhAChE (IC <sub>50</sub> )	hBuChE (IC <sub>50</sub> )
<b>97</b>	**	**	**
<b>98</b>	**	**	**
<b>93b</b>	**	**	**
<b>94a</b>	**	47.0 ± 4 µM	40.6 ± 5.7 µM
<b>94b</b>	***	**	13.5 ± 1,3 µM
<b>103</b>	**	**	**
<b>111a</b>	**	**	**
<b>110a</b>	**	**	**
<b>110b</b>	**	**	**
<b>109a</b>	**	**	**
<b>109b</b>	**	**	**
<b>115</b>	**	**	**
<b>113</b>	**	**	**
<b>Eserina</b>	151.40 ± 5.63 nM		
<b>Galantamina</b>	1.43 ± 0.03 µM		
<b>Tacrina</b>	130.90 ± 6.83 nM		32.73 ± 2.06 nM
<b>Rasagilina</b>	**	**	10.8 ± 0,44 µM

\*\* Inactivos a 100 µM (concentración más alta testada).

\*\*\* 100 µM inhibe la correspondiente actividad de AChE en aproximadamente un 30-40%. A altas concentraciones los compuestos precipitan.

### 5.3. ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA

Por último, los compuestos fueron sometidos a un estudio inicial para conocer su capacidad neuroprotectora tanto en ausencia como en presencia de agentes neurotóxicos. Para ello, utilizamos el método de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).

Es un método simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables.

El MTT es captado por las células y reducido por el enzima mitocondrial *succinato deshidrogenasa* a su forma insoluble formazan.<sup>183</sup> De esta forma se cuantifica la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico ya que se produce, como consecuencia de la reacción, un cambio de coloración de amarillo a azul.<sup>184,185</sup>

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular.

En nuestro caso se llevaron a cabo tres tipos de ensayos para los compuestos **91a, 91b, 92a, 92b, 93a, 93b, 94a, 94b, 97, 98, 100, 101, 102, 103, 109a, 109b, 110a, 110b, 111a, 111b, 112a, 112b, 113, 114, 115 y 116** en un cultivo de neuronas de corteza motora procedentes de embriones de rata Sprague Dawley de 19 días. Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  e.s.m. de al menos tres experimentos independientes (**Tabla 12**).

En primer lugar se estudió la capacidad de nuestros compuestos de inducir un efecto neuroprotector en ausencia de cualquier estímulo neurotóxico.

En segundo lugar se estudió el efecto neuroprotector de nuestros compuestos en presencia de glutamato, compuesto que provoca excitotoxicidad, un proceso patológico en el que las neuronas son dañadas al sobreactivarse los receptores (NMDA y AMPA/Kainato) del neurotransmisor excitatorio glutamato. Se produce entonces un aumento de iones de calcio en la neurona, se abre el poro de transición de permeabilidad mitocondrial, la mitocondria se hincha y

---

<sup>183</sup> Mosmann, T. J. *Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.

<sup>184</sup> Bar-Am, O.; Amit, T.; Youdim, M. B. H. *J. Neurochem.* **2007**, 103, 500.

<sup>185</sup> Rodríguez, J.; Vicente, V.; Canteras, M. *Patología* **1997**, 30 (1), 18.



se activan enzimas como *fosfolipasas*, *endonucleasas* y *proteasas* que continúan dañando estructuras celulares y conduciendo finalmente a la apoptosis.<sup>186</sup>

La excitotoxicidad está relacionada con enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington.

Por último, se analizó la capacidad de nuestros compuestos de proteger a las neuronas del daño producido por el  $H_2O_2$  el cual provoca la muerte neuronal por estrés oxidativo. El estrés oxidativo está presente en todas las enfermedades asociadas a la edad y al envejecimiento.

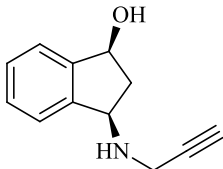
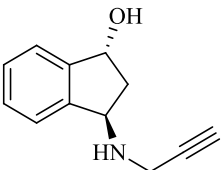
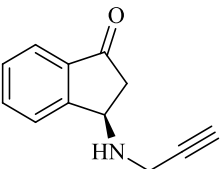
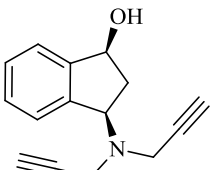
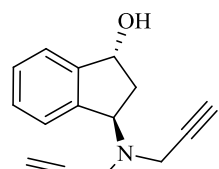
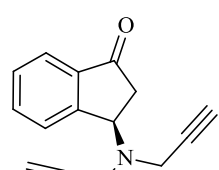
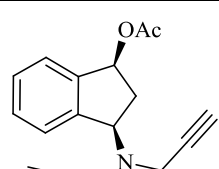
La rasagilina, al ser inhibidor de la MAO, evita que se forme  $H_2O_2$  aunque está descrito que su poder neuroprotector es independiente del efecto inhibidor de la MAO, y que protege del daño mediado por radicales libres en neuronas dopaminérgicas.<sup>187</sup>

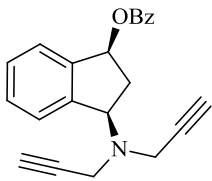
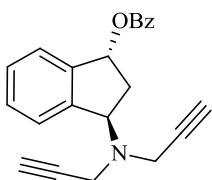
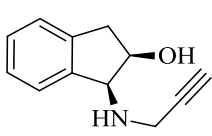
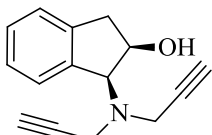
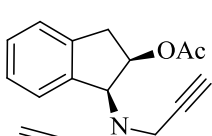
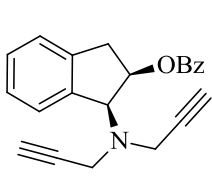
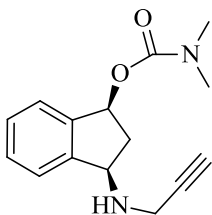
---

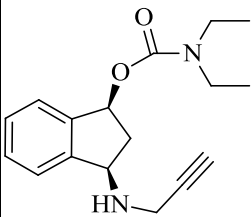
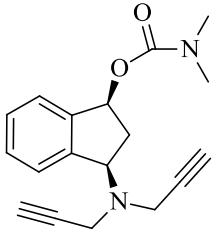
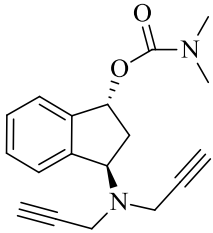
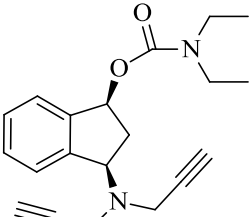
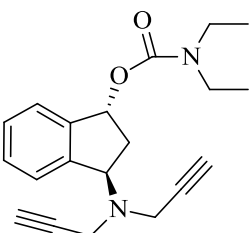
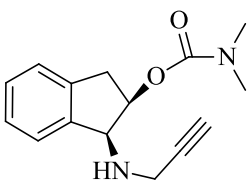
<sup>186</sup> Sengul, G.; Coskun, S.; Cakir, M.; Coban, M. K.; Saruhan, F.; Hacimuftuoglu, A. *Turk. Neurosurg.* **2011**, 21 (3), 367.

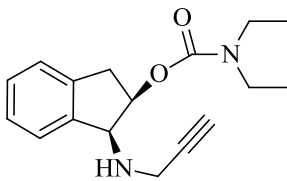
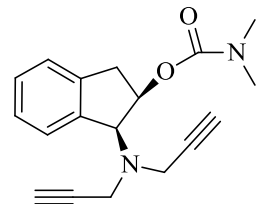
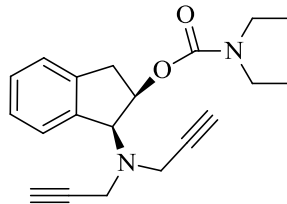
<sup>187</sup> Chau, K. Y.; Cooper, J. M.; Schapira, A. H. V. *Neurochem. Int.* **2010**, 57 (5), 525.

**Tabla 12. Capacidad neuroprotectora de los compuestos ensayados en ausencia de agentes neurotóxicos, en presencia de glutamato y en presencia de  $H_2O_2$ .**

Compuesto	Fórmula	% protección <sup>a</sup>	e.s.m.	Glutamato <sup>b</sup>	e.s.m.	$H_2O_2$ <sup>c</sup>	e.s.m.
91a		0	3,8	0,0	4,0	46,2	5,6
91b		23,4	4,6	15,2	2,0	14,5	2,1
97		7,4	4,1	1,8	6,0	24,8	3,2
92a		-5	6,2	0,0	3,0	17,8	4,8
92b		-1	4,3	-0,5	4,0	19,6	2,6
98		8,6	4,8	6,3	2,0	26,8	1,6
93a		0	4,6	-1,5	2,0	18,2	3,1

Compuesto	Fórmula	% protección <sup>a</sup>	e.s.m.	Glutamato <sup>b</sup>	e.s.m.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>c</sup>	e.s.m.
94a		-5,1	5,6	1,6	4,0	16,4	5,2
94b		6,9	8,0	-1,3	4,7	-5,8	3,0
100		0,0	2,8	0,0	6,5	-2,8	1,2
101		4,7	6,0	-0,2	1,6	-12,3	2,1
102		4,2	6,5	-8,1	4,9	-14,2	2,1
103		1,2	5,0	3,8	5,0	2,9	1,0
112a		21,2	8,5	-3,8	5,2	-9,3	1,8

Compuesto	Fórmula	% protección <sup>a</sup>	e.s.m.	Glutamato <sup>b</sup>	e.s.m.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>c</sup>	e.s.m.
111a		5,0	4,4	-4,0	5,6	-6,8	1,2
110a		2,8	1,8	-1,6	5,0	15,4	2,3
110b		27,4	4,1	7,6	5,0	9,8	2,8
109a		0	5	3,5	3,0	6,2	3,7
109b		18,2	5,9	4,3	2,0	10,2	2,1
116		11,5	8,8	-4,0	5,5	-9,1	2,4

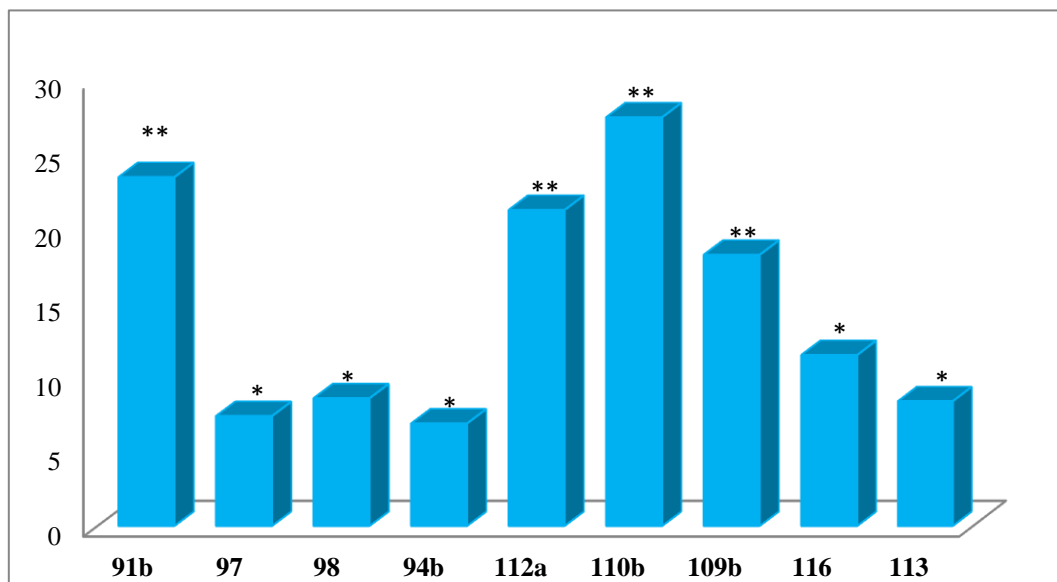
Compuesto	Fórmula	% protección <sup>a</sup>	e.s.m.	Glutamato <sup>b</sup>	e.s.m.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>c</sup>	e.s.m.
115		4,0	4,5	2,6	3,9	-6,1	1,1
114		-1,7	6,9	-5,2	5,9	-8,9	1,9
113		8,4	10,7	-5,2	2,3	-14,0	2,0

<sup>a</sup> % protección (comp 5 µM)

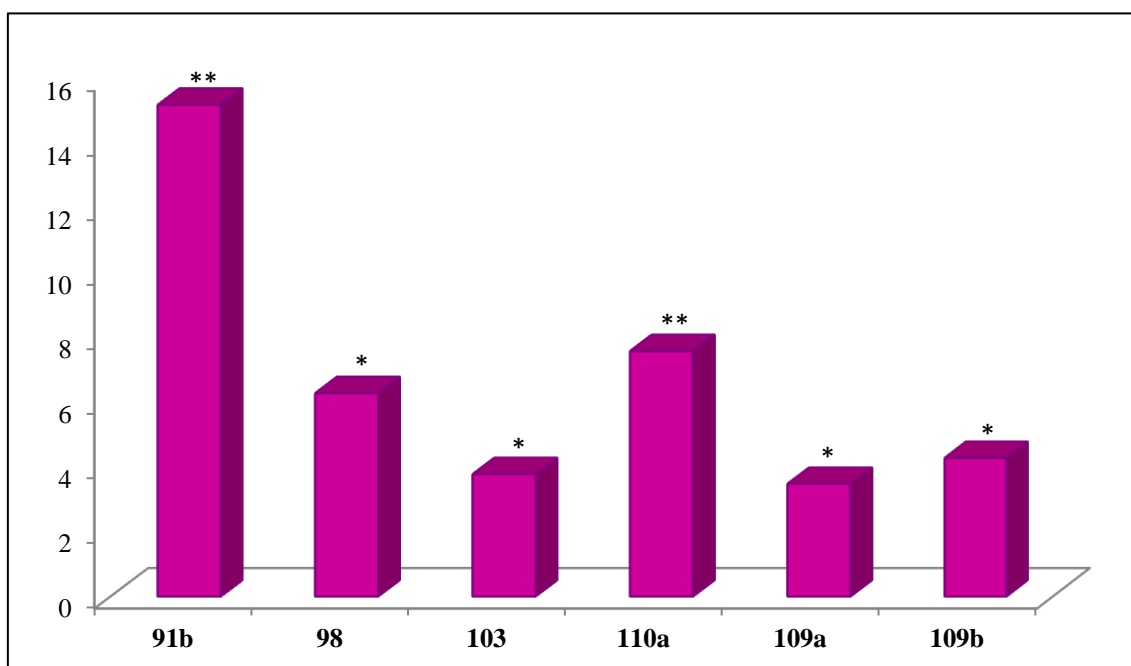
<sup>b</sup> % protección (comp 5 µM) frente a Glutamato 100 µM

<sup>c</sup> % protección (comp 5 µM) frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM

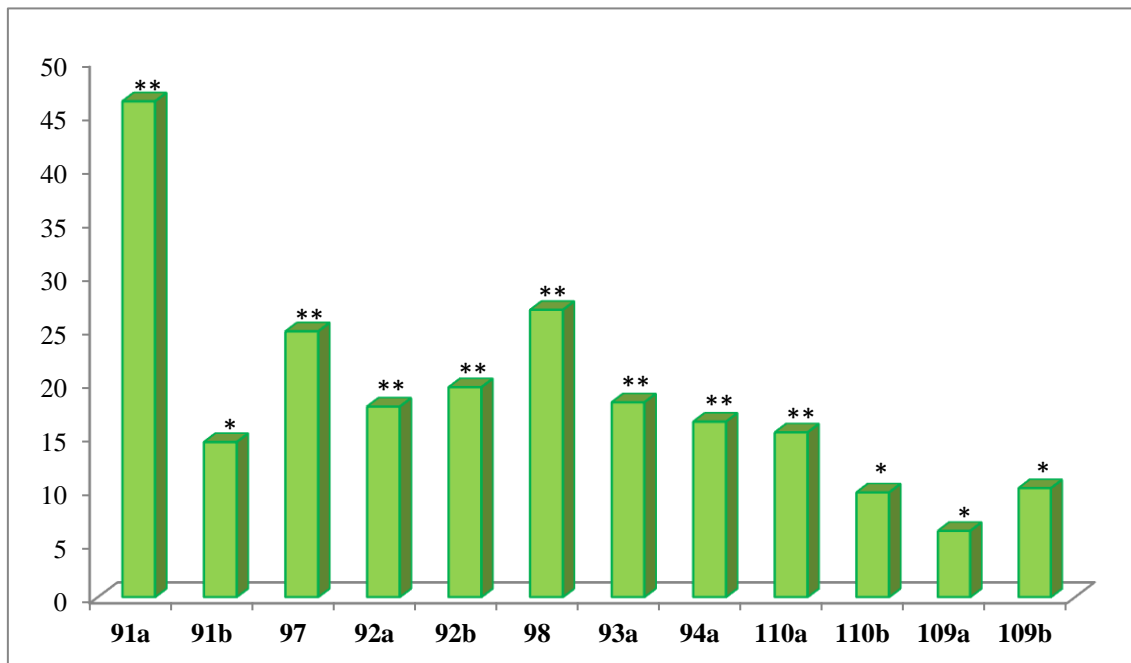
**Gráfica 1. Aumento de la viabilidad neuronal tras 24 horas de incubación de los compuestos ensayados.**



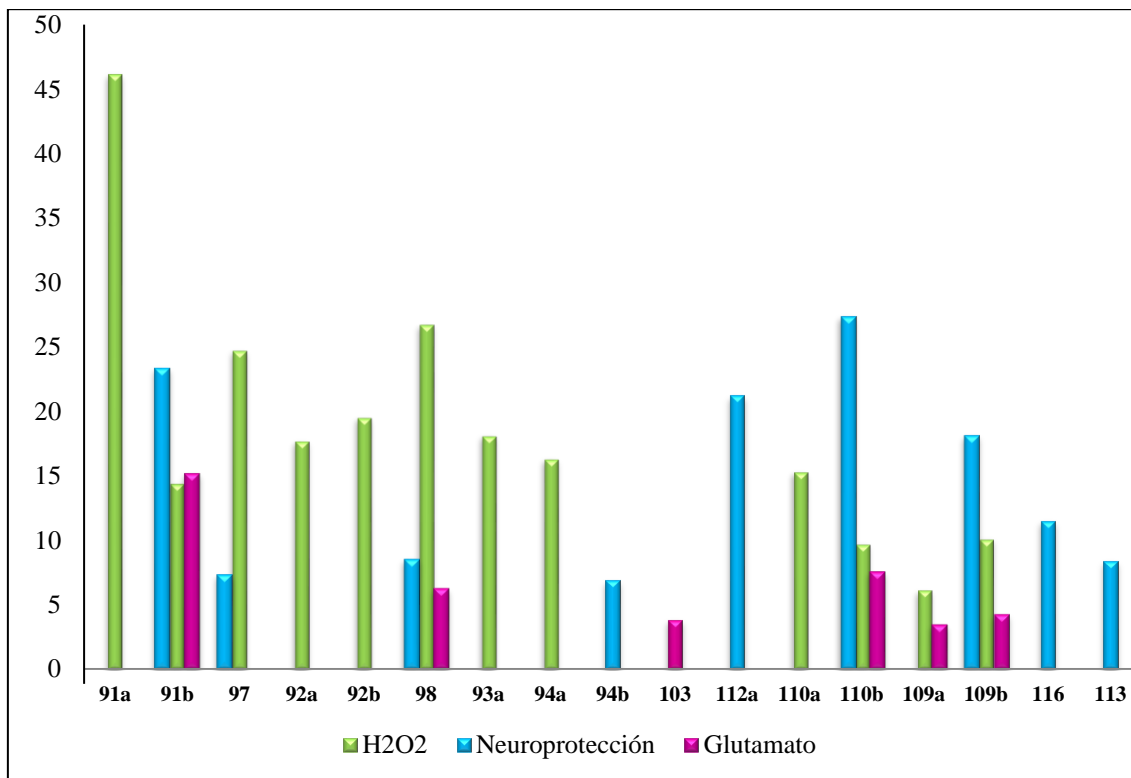
**Gráfica 2. Neuroprotección de los compuestos indicados frente a la toxicidad inducida por una concentración 100  $\mu$ M de glutamato.**



**Gráfica 3. Neuroprotección de los compuestos indicados frente a la toxicidad inducida por una concentración 100µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**



**Gráfica 4. Neuroprotección de los compuestos indicados para los tres casos.**



A la luz de los resultados obtenidos podemos decir que la mayor parte de los compuestos estudiados resultan neuroprotectores “per se”, siendo esperable que variando la concentración utilizada en estos experimentos muchos de ellos mejoren su actividad.

Por otra parte y como se puede apreciar en la gráfica 2 , hay seis compuestos (**91b, 98, 103, 109a, 109b** y **110a**) que protegen de forma significativa frente a la excitotoxicidad producida por glutamato y , véase gráfica 3, hay 12 compuestos (**91a, 91b, 92a, 92b, 93a, 94b, 97, 98, 103, 109a, 109b, 110a** y **110b**) que protegen frente al daño celular inducido por estrés oxidativo, siendo capaces de antagonizar la muerte neuronal provocada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El análisis conjunto de los resultados obtenidos en la evaluación inicial de nuestros compuestos indica que hay cuatro compuestos que resultan claramente neuroprotectores a la concentración ensayada (5μM): **91b, 98, 110b** y **109b**. Los cuatro compuestos aumentan no solo la viabilidad “basal” de las neuronas sino que también son capaces de antagonizar los dos estímulos tóxicos probados (glutamato y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Finalmente podemos decir que, al igual que ocurre en el caso de la rasagilina, el efecto neuroprotector exhibido por nuestros compuestos parece ser independiente de la inhibición de la MAO-B y de las *colinesterasas*, dado el bajo nivel de inhibición de dichos enzimas presentado por nuestros compuestos, pudiendo, posiblemente, explicarse el efecto neuroprotector de los mismos a través de otro mecanismo en el que la formación y/o la participación de radicales óxido jugara un papel determinante en el proceso de formación del daño neuronal, debido al importante grado de protección que presentan nuestros compuestos frente al daño celular inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



## ***6. CONCLUSIONS***



## Conclusions

---

1. We have developed a synthetic method, from the *cis/trans* mixture of amino alcohols **84**, which allows to obtain new derivatives of rasagiline substituted at position 3 of the indan ring by an oxygen function (OH, OAc, OBz, OC(O)NMe<sub>2</sub> and OC(O)Net<sub>2</sub>). In certain cases, they have a second propargyl group on the nitrogen atom, and have a *cis/trans* spatial relationship between the substituents of 1 and 3 positions.
2. Analogously, and from the commercial amino alcohols **99** and **104** we have prepared novel derivatives of rasagiline enantiomerically pure substituted at 2 position of the indan ring by an oxygen function (OH, OAc, OBz, OC(O)NMe<sub>2</sub> and OC(O)Net<sub>2</sub>). In some cases they have a second propargyl group on the nitrogen atom, too. These compounds prepared have a *cis* disposition between the substituents of 1 and 2 positions.
3. All these compounds have been subjected to a spectroscopy analysis IR, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR for their identification and structural characterization.
4. The different analogues of rasagiline prepared have undergone to an initial pharmacological evaluation, in order to find out their inhibitory capacity against the two isoforms of *monoamino oxidase* and *acetyl* and *butyrylcholinesterase*, as well as to determine their neuroprotective capacity “per se” and in presence of some neurotoxic agents, such as glutamate and hydrogen peroxide.

We have found that most of the compounds show significant neuroprotective activity, and the most outstanding results were obtained for compounds **91b**, **98**, **110b** and **109b**, which notably increase the basal viability of neurons and they are able, also, to antagonize the toxic stimuli of glutamate and hydrogen peroxide.



***ANEXOS***



## Synthesis and Antiviral Activities of Novel Purinyl- and Pyrimidinyl-carbanucleosides Derived from Indan<sup>1</sup>

Nerea Alonso,<sup>a</sup> Olga Caamaño,<sup>a</sup> Franco Fernández,<sup>a</sup> Xerardo García-Mera,<sup>\*a</sup> Melvin Morales,<sup>a</sup> José Enrique Rodríguez-Borges,<sup>b</sup> Eric De Clercq<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Orgánica, Facultade de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Fax +34(981)594912; E-mail: qoxgmara@usc.es

<sup>b</sup> CIQ, Departamento de Química, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre 687, 4169-007 Porto, Portugal

<sup>c</sup> Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, 3000 Leuven, Belgium

Received 7 February 2008

**Abstract:** Starting from ( $\pm$ )-*trans*- and ( $\pm$ )-*cis*-3-hydroxymethyl-1-indanol, novel 6-substituted purinylcarbanucleoside derivatives of indan were synthesised through a key coupling reaction with 6-chloropurine under Mitsunobu conditions. Suzuki–Miyaura reactions of the protected 6-chloropurine derivative with different arylboronic acids afforded the corresponding 6-arylpurinylcarbanucleoside derivatives. Finally, three new 5-halouracilcarbanucleosides were prepared by the reaction of a uracilcarbanucleoside with different *N*-halosuccinimides. All of the new analogues were evaluated for antiviral activity against a wide variety of viruses.

**Key words:** synthesis, indan carbanucleosides, Mitsunobu reaction, Suzuki–Miyaura reaction, antiviral activity

Carbocyclic nucleosides (carbanucleosides) are analogues of nucleosides in which a methylene group has replaced the oxygen atom in the furanose ring.<sup>2</sup> These analogues show similar biological activities to the parent nucleosides and have higher metabolic and chemical stability against different phosphorylases, hydrolases, and cleaving agents.<sup>3</sup> Of the different carbanucleosides prepared to date, carbovir<sup>4</sup> has shown significant anti-HIV activity through the selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase. Its derivative abacavir<sup>5</sup> is equally potent but is less toxic, has greater bioavailability and has been approved by the FDA for the treatment of HIV infection (Figure 1). Both of these compounds are cyclopentenyl carbanucleosides and their anti-HIV capacity has stimulated the development of new carbanucleosides in which the carbocycle is a cyclopentane ring.

In the last two years our research group has prepared different series of carbanucleosides derived from indan and these bear purine and pyrimidine bases and are of the types 1'-homo derivative<sup>6</sup> and 5'-nor-1'-homo derivative.<sup>7</sup> These were synthesised with the aim of increasing the liposolubility of the compounds and to facilitate their access to the central nervous system, a significant reservoir of HIV and other viruses.<sup>8</sup> Some of these compounds showed interesting cytostatic activity, particularly the 6-arylpurinyl derivatives (which is in keeping with reports concerning 6-arylpurinylribonucleosides).<sup>9</sup>

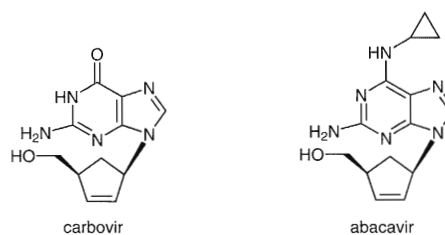
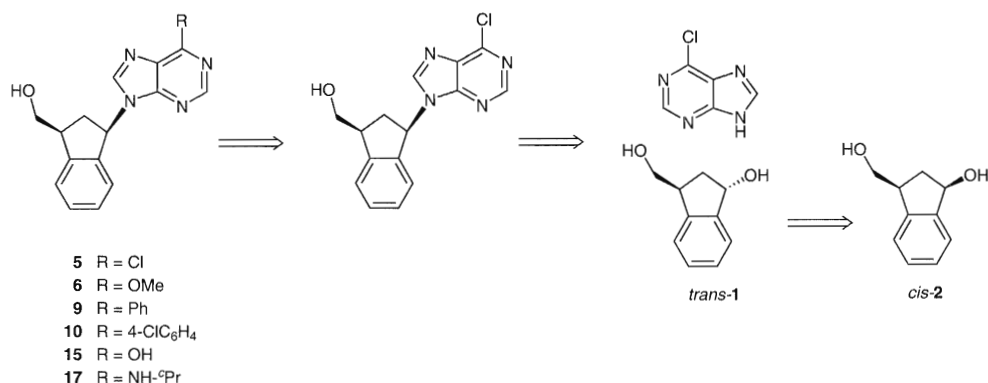


Figure 1 Carbovir and abacavir

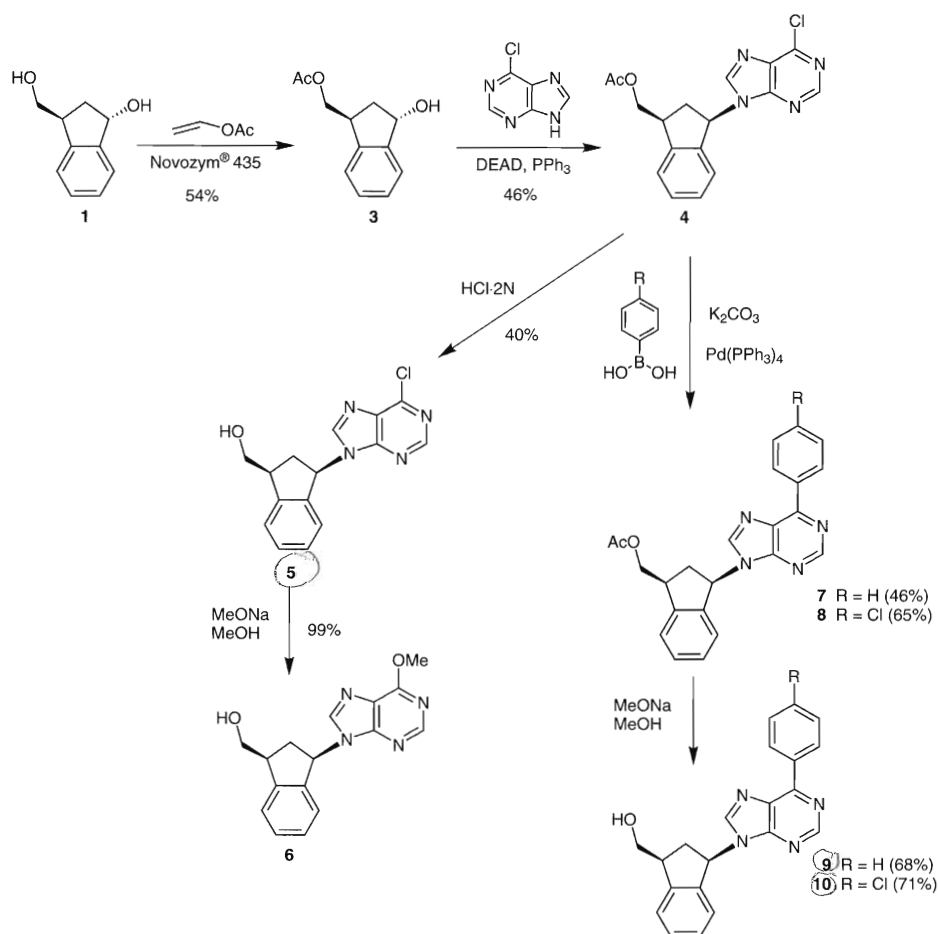
As a logical continuation of our research into the preparation and pharmacological evaluation of novel carbanucleosides derived from indan, we report here the synthesis of a new series of nucleosides in which the link between the carbocycle bearing the base (purine or pyrimidine) and the hydroxyl group is the same as in natural nucleosides. More specifically, we report the synthesis and antiviral and cytostatic activities of a series of indanyl carbanucleosides bearing purine and pyrimidine bases.

Retrosynthetic analysis (Scheme 1) led to the choice of diol *trans*-1 as the starting material for the preparation of the different purine derivatives. Appropriate functionalisation of *trans*-1 enables the coupling with 6-chloropurine under Mitsunobu conditions. This reaction leads to inversion of the configuration at the carbon bearing the secondary hydroxyl group and gives the key intermediate with a *cis* disposition. Acid hydrolysis of this compound gave analogue 5, which on replacement of the chloro substituent of the purine ring gave the 6-substituted purinylcarbanucleosides 6, 15, and 17, while Suzuki–Miyaura cross-coupling with appropriate boronic acids would give 6-arylpurinylcarbanucleosides 9 and 10.

Diol *trans*-1 was obtained from phenylsuccinic anhydride by Friedel–Crafts reaction with aluminium trichloride in 1,2-dichloroethane followed by esterification with methanol in sulfuric acid<sup>10</sup> and treatment with lithium borohydride in tetrahydrofuran. In this way a 17:83 mixture of ( $\pm$ )-*trans*-1 and ( $\pm$ )-*cis*-2 was obtained and this was efficiently resolved by chromatography on silica gel.<sup>7a</sup> Diol ( $\pm$ )-*trans*-1 is the starting material required to obtain analogues with a *cis* disposition, but this compound was only obtained in small quantities. As a result, we decided to use



Scheme 1

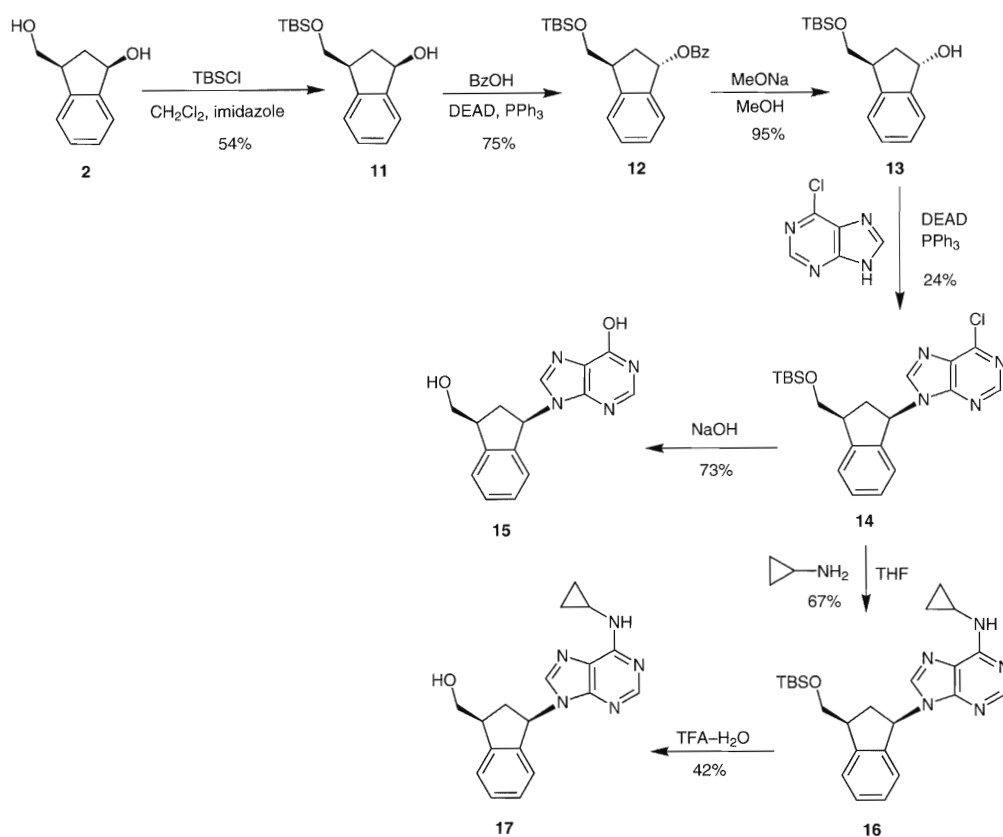


Scheme 2

the diol ( $\pm$ )-*cis*-2 as a starting material as this could be transformed into ( $\pm$ )-*trans*-1 through a Mitsunobu reaction with benzoic acid. Protection of the primary alcohol in *trans*-1 was achieved by enzymatic transesterification with vinyl acetate using *Candida antarctica* lipase (Novozym® 435)<sup>11</sup> to give the monoacetylated derivative **3** as the only product in 93% yield. 6-Chloropurine was

condensed with **3** in the presence of triethylphosphine and diethyl azodicarboxylate in a standard Mitsunobu reaction,<sup>12</sup> to give the key intermediate **4** in 46% yield. Treatment of **4** with aqueous 2 N hydrochloric acid in tetrahydrofuran gave 6-chloropurinylnucleoside **5** in 40% yield. Subsequent treatment of **5** with MeONa in MeOH gave 6-methoxypurinylnucleoside **6** in 99%





Scheme 3

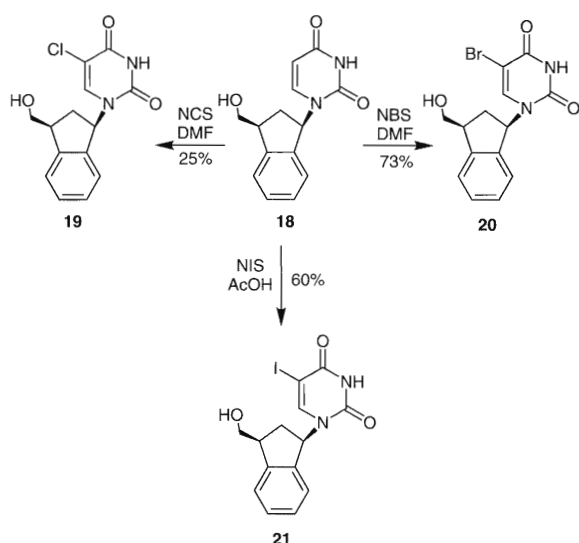
yield. On the other hand, on following the conditions reported by Hocek and co-workers,<sup>13</sup> the chloro substituent in position 6 of the purine was replaced in a Suzuki–Miyaura cross coupling reaction of **4** with different arylboronic acids in anhydrous toluene containing tetrakis(triphenylphosphine)palladium as a catalyst and potassium carbonate as a base.<sup>14</sup> This procedure gave 46–65% yields of compounds **7** and **8**. Deprotection of these compounds with MeONa in MeOH afforded the 6-arylpurinylcarbanucleosides **9** and **10** in yields of 68–71% (Scheme 2).

The primary alcohol of *cis*-**2** was protected by reaction with *tert*-butyldimethylsilyl chloride and imidazole in dichloromethane,<sup>15</sup> and the secondary alcohol of the resulting compound **11** was reacted with benzoic acid under Mitsunobu conditions to give compound **12** in 75% yield. Compound **12** had the required *trans* disposition. Deprotection of the secondary alcohol using MeONa in MeOH gave the key intermediate **13** in 95% yield. Compound **13** was used in the coupling with 6-chloropurine, through a Mitsunobu reaction, to give 6-chloropurinylcarbanucleoside **14** in 24% yield (with a *cis* disposition). Treatment of **14** with aqueous 0.25 N NaOH in 1,4-dioxane afforded the 6-hydroxypurinylcarbanucleoside **15** in one step and in 73% yield, while treatment with *N*-cyclopropylamine in tetrahydrofuran followed by deprotection with a 3:1 mixture of trifluoroacetic acid–water gave the 6-*N*-cyclo-

propylpurinylcarbanucleoside **17** in an overall yield of 28% (Scheme 3).

Finally, the 5-halouracilcarbanucleosides **19**, **20**, and **21** (Scheme 4) were obtained by the reaction of uracilcarbanucleoside **18**, previously reported by us,<sup>16</sup> with the corresponding *N*-halosuccinimide in DMF (**19**; 25% and **20** 73%) or AcOH (**21**; 60%).<sup>17</sup>

Compounds **5**, **6**, **9**, **10**, **15**, **17**, **19**, **20**, and **21** were evaluated for antiviral activity<sup>18</sup> against a wide variety of viruses, including Cytomegalovirus (AD 169 and Davis strains), Varicella-zoster virus (OKA and 07/1 strains), Herpes simplex virus type 1 (strain KOS), Herpes simplex virus type 2 (strain G), Vaccinia virus and Vesicular stomatitis virus in HEL cell cultures; Coxsackie virus B4, Respiratory syncytial virus and Vesicular stomatitis virus in HeLa cell cultures; Para-influenza-3 virus, Sindbis, Coxsackie virus B4 and Punta Toro virus in Vero cell cultures; Influenza A virus (H1N1 and H3N2 subtypes) and Influenza B virus in MDCK cell cultures; and Feline Corona virus and Feline Herpes Virus in CRFK cell cultures. The most outstanding results were obtained for compound **10**, which showed moderate antiviral effects against *Varicella-zoster virus* (OKA strain), *Vaccinia virus*, *Herpes simplex virus-1* (KOS) and *Herpes simplex virus-2* (G) in HEL cell cultures with EC<sub>50</sub> values of 6.0, 12, 12, and 12 µg/mL, respectively, and compounds **5** and **9**, which



Scheme 4

showed moderate antiviral effects against Coxsackie virus B4 in Vero cell cultures with EC<sub>50</sub> values of 12 µg/mL.

In conclusion, we have described the synthesis of nine novel carbocyclic nucleosides that are indan derivatives (**5**, **6**, **9**, **10**, **15**, **17**, **19**, **20**, and **21**) with a pseudosugar based on indanol, a template in which the double bond of the cyclopentenyl nucleosides is embedded in a benzene ring. Evaluation of the antiviral activity of these compounds showed that compounds **5**, **9**, and **10** had moderate antiviral effects.

Silica gel (230 mesh) was purchased from Merck. All other chemicals used were of reagent grade and were obtained from Aldrich Chemical Co. Melting points were determined using a Reichert Kofler Thermopan or in capillary tubes on a Büchi 510 apparatus, and are uncorrected. IR spectra were recorded on a PerkinElmer 1640-FT spectrophotometer. <sup>1</sup>H NMR spectra (300 MHz) and <sup>13</sup>C NMR spectra (75.47 MHz) were recorded on a Bruker AMX spectrometer, using TMS as internal standard [chemical shifts (δ) in ppm, *J* in Hz]. Elemental analyses were obtained on a PerkinElmer 240B microanalyser by the Microanalysis Service of the University of Santiago de Compostela. Flash chromatography was performed on silica gel (Merck 60, 230–240 mesh) and analytical TLC on pre-coated silica gel plates (Merck 60 F254, 0.25 mm).

**(±)-trans-3-Hydroxymethyl-1-indanol (1) and (±)-cis-3-Hydroxymethyl-1-indanol (2)**

A solution of methyl 3-oxo-1-indanecarboxylate<sup>6a</sup> (12.48 g, 70.61 mmol) in anhyd THF (110 mL) was added dropwise under argon to a suspension of LiBH<sub>4</sub> (8.09 g, 353.06 mmol) in the same solvent (80 mL). The mixture was stirred for 12 h and sat. aq. NH<sub>4</sub>Cl (40 mL) was added dropwise at 0 °C. The resulting mixture was filtered through Celite and the aqueous and organic phases were separated. The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 100 mL) and the combined organic phases were washed with brine (120 mL), dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), and concentrated under vacuum. Chromatography of the resulting yellow oil on a column of silica gel (295 g) with 40:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–*i*-PrOH as eluent afforded *cis*-**2** in the early fractions as an oil that spontaneously solidified [yield: 8.22 g (78%); mp 78–80 °C

(Et<sub>2</sub>O–cyclohexane)] and *trans*-**1** in the later fractions as a yellow oil [yield: 1.76 g (15%)].

**(±)-cis-2**

IR (KBr): 3250, 2984, 2933, 1461, 1407, 1379, 1281, 1263, 1211, 1173, 1067, 1051, 1025, 777, 743, 577 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.74–1.81 (m, 1 H, 2β-H), 2.20–2.40 (m, 1 H, OH, D<sub>2</sub>O exch), 2.49–2.57 (m, 1 H, 2α-H), 3.20–3.50 (m, 1 H, 3β-H), 3.40–3.50 (br s, 1 H, OH, D<sub>2</sub>O exch), 3.72–3.83 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>OH), 4.91–5.01 (m, 1 H, 1β-H), 7.18–7.35 (m, 4 H, ArH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 39.37 (CH<sub>2</sub>), 45.63 (CH), 65.60 (CH<sub>2</sub>), 74.83 (CH), 124.56, 125.24, 128.02 and 129.17 (CH), 143.77 and 146.43 (C).

Anal. Calcd for C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>: C, 73.15; H, 7.37. Found: C, 73.41; H, 7.17.

**(±)-trans-1**

IR (film): 3265, 2922, 1455, 1409, 1372, 1267, 1205, 1169, 1054, 1045, 768, 745, 573 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.02–2.13 (m, 1 H, 2β-H), 2.24–2.34 (m, 1 H, 2α-H), 3.43–3.50 (m, 1 H, 3β-H), 3.68–3.70 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>OH), 5.22–5.26 (m, 1 H, 1α-H), 7.23–7.40 (m, 4 H, ArH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 47.06 (CH<sub>2</sub>), 52.87 (CH), 73.73 (CH<sub>2</sub>), 82.85 (CH), 132.20, 132.38, 135.36 and 136.31 (CH), 151.12 and 153.27 (C).

Anal. Calcd for C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>: C, 73.15; H, 7.37. Found: C, 73.36; H, 7.13.

**(±)-trans-3-Hydroxy-1-indanylmethyl Acetate (3)**

To a suspension of the lipase Novozym<sup>®</sup> 435 (0.140 g, 0.321 mmol) and diol **1** (0.550 g, 3.35 mmol) in THF (25 mL) was added a solution of vinyl acetate (0.32 mL, 3.35 mmol) in THF (30 mL) at 0 °C under argon. The mixture was stirred for 4 h at 0 °C and then at r.t. for 68 h. The mixture was filtered through Celite and the solvent was removed under reduced pressure to give a yellow oil, which was purified by column chromatography on silica gel (30.4 g) using hexane–EtOAc (8:1) as eluent to give **3** as a colourless oil; yield: 0.300 g (54%).

IR (film): 3385, 1734, 1556, 1458, 1349, 1259, 1134, 1034, 832, 738 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.06 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.17–2.27 (m, 2 H, 2β-H + 2α-H), 3.64–3.70 (m, 1 H, 1β-H), 4.10–4.25 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>OAc), 5.28–5.33 (m, 1 H, 3α-H), 7.26–7.45 (m, 4 H, ArH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 21.38 (CH<sub>3</sub>), 40.10 (CH<sub>2</sub>), 42.24 (CH), 67.82 (CH<sub>2</sub>), 75.46 (CH), 124.98, 125.14, 128.29 and 129.14 (CH), 143.40, 145.61, 171.54 (C).

Anal. Calcd for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>: C, 69.88; H, 6.84. Found: C, 70.03; H, 6.99.

**(±)-cis-3-(6-Chloro-9H-purin-9-yl)indanylmethyl Acetate (4)**

To a solution of **3** (0.42 g, 2.03 mmol), PPh<sub>3</sub> (1.07 g, 4.06 mmol), and 6-chloropurine (0.63 g, 4.06 mmol) in THF (20 mL) was added dropwise a solution of DEAD (1.86 mL, 4.06 mmol) in THF (15 mL) at 0 °C under argon. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h and at r.t. for 65 h. The solvent was removed under reduced pressure to give a solid, which was purified by column chromatography on silica gel (113 g) using hexane–EtOAc (2:1) as eluent to give an oil that crystallised spontaneously to give **4** as a colourless solid; yield: 0.17 g (46%); mp 35–38 °C (pentane).

IR (KBr): 2979, 1731, 1591, 1578, 1557, 1497, 1436, 1402, 1354, 1336, 1236, 1040, 941, 859, 763 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.05 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.06–2.17 (dt, *J*<sub>H</sub> = 13.64 Hz, *J*<sub>dd</sub> = 7.75 Hz, 1 H, 2β-H), 3.05–3.17 (dt, *J*<sub>H</sub> = 13.64 Hz,

$J_{(d)} = 8.29$  Hz, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.60–3.71 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 4.26–4.34 (part A of an ABM system,  $J_{A,B} = 11.72$  Hz,  $J_{A,M} = 6.90$  Hz, 1 H, CHHOAc), 4.38–4.45 (part B of an ABM system,  $J_{B,A} = 11.72$  Hz,  $J_{B,M} = 6.62$  Hz, 1 H, CHHOAc), 6.24–6.31 (t,  $J = 8.29$  Hz, 1 H, 3 $\beta$ -H), 7.05–7.08 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H, ArH), 7.26–7.44 (m, 3 H, ArH), 7.99 (s, 1 H, 8'-H), 8.77 (s, 1 H, 2'-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 20.34$  ( $\text{CH}_3$ ), 37.12 ( $\text{CH}_2$ ), 41.50 (CH), 57.76 (CH), 65.93 ( $\text{CH}_2$ ), 123.88, 124.26, 127.99 and 129.17 (CH), 131.28 (C), 138.88 (C), 142.66 (C), 143.20 (CH), 150.66 (C), 151.44 (CH), 156.21 (C) and 170.40 (C).

Anal. Calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_2$ : C, 59.57; H, 4.41; N, 16.34. Found: C, 59.36; H, 4.73; N, 16.56.

**( $\pm$ )-cis-3-(6-Chloro-9H-purin-9-yl)-1-indanylmethanol (5)**

To a solution of **4** (0.175 g, 0.510 mmol) in THF was added aq 2 N HCl (10 mL) and the mixture was stirred for 20 h at 40 °C. The mixture was neutralised with aq 2 N NaOH (12 mL) and the solvent was removed under reduced pressure followed by several co-evaporations with toluene and EtOH. This process gave a colourless solid, which was purified by column chromatography on silica gel (50 g) using hexane–EtOAc (1:3) as eluent to give compound **5** as a colourless solid; yield: 0.06 g (40%).

IR (KBr): 3285, 2887, 1594, 1561, 1446, 1396, 1339, 1259, 927, 763, 653, 548  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.27$ –2.36 (dt,  $J_{(t)} = 13.97$  Hz,  $J_{(d)} = 6.53$  Hz, 1 H, 2 $\beta$ -H), 3.03–3.13 (dt,  $J_{(t)} = 13.98$  Hz,  $J_{(d)} = 8.81$  Hz, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.52–3.60 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 3.95–4.12 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 6.25–6.30 (t,  $J_{(t)} = 6.81$  Hz, 1 H, 3 $\beta$ -H), 7.02–7.05 (d,  $J_{(d)} = 7.61$  Hz, 1 H, ArH), 7.24–7.29 (m, 1 H, ArH), 7.37–7.42 (t,  $J_{(t)} = 7.56$  Hz, 1 H, ArH), 7.43–7.47 (t,  $J_{(t)} = 7.45$  Hz, 1 H, ArH), 8.12 (s, 1 H, 8'-H), 8.75 (s, 1 H, 2'-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 36.19$  ( $\text{CH}_2$ ), 45.28 (CH), 58.63 (CH), 64.81 ( $\text{CH}_2$ ), 124.47, 124.68, 128.23 and 129.66 (CH), 131.71 (C), 140.11 (C), 144.02 (C), 144.52 (CH), 150.99 (C), 151.81 (CH).

Anal. Calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}$ : C, 59.91; H, 4.36; N, 18.63. Found: C, 60.15; H, 4.11; N, 18.40.

**( $\pm$ )-cis-3-(6-Methoxy-9H-purin-9-yl)-1-indanylmethanol (6)**

To a solution of **5** (0.030 g, 0.101 mmol) in MeOH (10 mL) was added a 1 M solution of NaOMe in MeOH (0.11 mL, 0.11 mmol) and the mixture was stirred for 6 h at r.t. under argon. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel (3.15 g) using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ –*i*-PrOH (30:1) as eluent to give **6** as a colourless solid; yield: 0.030 g (99%).

IR (film): 3394, 1602, 1480, 1316, 1229, 1056, 760, 649  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.65$  (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.33–2.42 (dt,  $J_{(t)} = 13.96$  Hz,  $J_{(d)} = 6.98$  Hz, 1 H, 2 $\beta$ -H), 3.00–3.11 (dt,  $J_{(t)} = 13.94$  Hz,  $J_{(d)} = 8.82$  Hz, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.52–3.60 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 3.90–4.01 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{OAc}$ ), 4.19 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.17–6.22 (t,  $J_{(t)} = 7.87$  Hz, 1 H, 3 $\beta$ -H), 7.01–7.04 (d,  $J_{(d)} = 7.58$  Hz, 1 H, ArH), 7.23–7.31 (m, 1 H, ArH), 7.36–7.46 (m, 2 H, ArH), 7.88 (s, 1 H, 2'-H), 8.51 (s, 1 H, 8'-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 35.84$  ( $\text{CH}_2$ ), 45.16 (CH), 54.08 ( $\text{CH}_3$ ), 58.41 (CH), 64.82 ( $\text{CH}_2$ ), 124.40, 124.83, 127.92 and 129.22 (CH), 140.34 (CH), 140.58 (CH), 143.59 (C), 144.06 (C), 151.73 (CH), 160.99 (C).

Anal. Calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$ : C, 64.85; H, 5.44; N, 18.91. Found: C, 65.16; H, 5.29; N, 19.13.

**( $\pm$ )-cis-3-(6-Phenyl-9H-purin-9-yl)-1-indanylmethyl Acetate (7)**

A mixture of **4** (0.154 g, 0.83 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.085 g, 0.675 mmol), 6-phenylboronic acid (0.094 g, 0.675 mmol), and Pd( $\text{PPh}_3$ )<sub>4</sub> (0.046

g) in anhyd toluene (80 mL) was stirred for 12 h at 100 °C under argon. The solvent was removed by vacuum distillation and the residue was purified by column chromatography on silica gel (48 g) using hexane–EtOAc (4:1) as eluent to give **7** as a yellow oil, which crystallised spontaneously as a colourless solid; yield: 0.08 g (46%); mp 38–41 °C ( $\text{CHCl}_3$ –hexane).

IR (KBr): 3418, 2919, 1734, 1649, 1560, 1536, 1457, 1351, 1223, 1021, 765, 694  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.05$  (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 2.09–2.21 (dt,  $J_{(t)} = 13.52$  Hz,  $J_{(d)} = 7.77$  Hz, 1 H, 2 $\beta$ -H), 3.08–3.20 (dt,  $J_{(t)} = 13.52$  Hz,  $J_{(d)} = 8.18$  Hz, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.62–3.73 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 4.35–4.42 (part A of an ABM system,  $J_{A,B} = 11.11$  Hz,  $J_{A,M} = 6.30$  Hz, 1 H, CHHOAc), 4.44–4.51 (part B of an ABM system,  $J_{B,A} = 11.11$  Hz,  $J_{B,M} = 5.59$  Hz, 1 H, CHHOAc), 6.31–6.38 (t,  $J = 7.89$  Hz, 1 H, 3 $\beta$ -H), 7.10–7.13 (d,  $J = 7.62$  Hz, 1 H, ArH), 7.26–7.61 (m, 6 H, ArH), 7.98 (s, 1 H, 8'-H), 8.78–8.81 (d,  $J = 7.63$  Hz, 2 H, ArH), 9.06 (s, 1 H, 2'-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 21.31$  ( $\text{CH}_3$ ), 38.29 ( $\text{CH}_2$ ), 42.46 (CH), 58.02 (CH), 66.97 ( $\text{CH}_2$ ), 124.94, 125.15, 128.83, 129.10, 129.88 and 130.20 (CH), 131.43 (C), 136.08 (C), 143.06 (CH), 143.61 (C), 152.83 (CH) and 171.34 (C).

Anal. Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$ : C, 71.86; H, 5.24; N, 14.57. Found: C, 71.61; H, 5.03; N, 14.80.

**( $\pm$ )-cis-3-[6-(4'-Chlorophenyl)-9H-purin-9-yl]-1-indanylmethyl Acetate (8)**

Reaction of **4** with 6-chlorophenylboronic acid, following an identical procedure to that described for **7** gave **8** as a clear oil that spontaneously crystallised to a colourless solid; yield (65%); mp 60–63 °C ( $\text{CHCl}_3$ –hexane).

IR (KBr): 3412, 1734, 1649, 1578, 1514, 1496, 1469, 1445, 1325, 1221, 1014, 843, 803, 747, 646  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.04$  (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 2.09–2.19 (dt,  $J_{(t)} = 13.58$  Hz,  $J_{(d)} = 7.70$  Hz, 1 H, 2 $\beta$ -H), 3.07–3.17 (dt,  $J_{(t)} = 13.58$  Hz,  $J_{(d)} = 8.10$  Hz, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.64–3.71 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 4.35–4.41 (part A of an ABM system,  $J_{A,B} = 11.11$  Hz,  $J_{A,M} = 6.30$  Hz, 1 H, CHHOAc), 4.43–4.48 (part B of an ABM system,  $J_{B,A} = 11.11$  Hz,  $J_{B,M} = 5.58$  Hz, 1 H, CHHOAc), 6.30–6.35 (t,  $J = 7.85$  Hz, 1 H, 3 $\beta$ -H), 7.09–7.11 (d,  $J = 7.60$  Hz, 1 H, ArH), 7.26–7.49 (m, 3 H, ArH), 7.50–7.53 (d,  $J = 8.57$  Hz, 2 H, ArH), 7.97 (s, 1 H, 8'-H), 8.78–8.81 (d,  $J = 8.57$  Hz, 2 H, ArH), 9.02 (s, 1 H, 2'-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 21.27$  ( $\text{CH}_3$ ), 38.21 ( $\text{CH}_2$ ), 42.47 (CH), 58.07 (CH), 66.96 ( $\text{CH}_2$ ), 124.91, 125.17, 128.83, 129.31, 129.91 and 131.52 (CH), 131.58 (C), 134.56 (C), 137.67 (C), 140.37 (C), 143.22 (CH), 143.63 (C), 152.76 (CH), 153.19 (C), 154.02 (C) and 171.30 (C).

Anal. Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{ClN}_4\text{O}_2$ : C, 65.95; H, 4.57; N, 13.38. Found: C, 66.22; H, 4.35; N, 13.57.

**( $\pm$ )-cis-3-(6-Phenyl-9H-purin-9-yl)-1-indanylmethanol (9)**

To a solution of **7** (0.05 g, 0.13 mmol) in MeOH (5 mL) was added powdered 95% NaOMe (0.015 g, 0.264 mmol) and the mixture was stirred for 20 h under argon. The solution was neutralised by the addition of Dowex 50  $\times$  8 ( $\text{H}^+$ ) resin (ca. 100 mg) and the mixture was stirred for 20 min. The resin was filtered off and washed with MeOH saturated with ammonia (10 mL) and MeOH (10 mL). The filtrates were combined and concentrated to dryness. The resulting colourless solid was purified by column chromatography on silica gel (6 g) using hexane–EtOAc (1:2) as eluent to give **9** as a colourless solid; yield: 0.034 g (68%); mp 53–56 °C ( $\text{CHCl}_3$ –hexane).

IR (KBr): 3378, 2921, 1654, 1562, 1499, 1488, 1457, 1416, 1399, 1350, 1325, 1265, 1218, 1131, 1030, 828, 764, 694, 647  $\text{cm}^{-1}$ .

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 2.28–2.40 (dt,  $J_{(t)} = 13.85$  Hz,  $J_{(d)} = 7.10$  Hz, 1 H, 2 $\beta$ -H), 2.95–3.07 (dt,  $J_{(t)} = 13.85$  Hz,  $J_{(d)} = 8.70$  Hz, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.44–3.54 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 3.88–3.94 (part A of an ABM system,  $J_{A,B} = 10.74$  Hz,  $J_{A,M} = 4.12$  Hz, 1 H, CHHOH), 3.99–4.05 (part B of an ABM system,  $J_{B,A} = 10.74$  Hz,  $J_{B,M} = 6.38$  Hz, 1 H, CHHOH), 6.19–6.26 (t,  $J = 7.56$  Hz, 1 H, 3 $\beta$ -H), 6.97–7.01 (d,  $J = 7.56$  Hz, 1 H, ArH), 7.08–7.53 (m, 6 H, ArH), 8.03 (s, 1 H, 8'-H), 8.67–8.71 (d,  $J = 7.68$  Hz, 2 H, ArH), 8.93 (s, 1 H, 2'-H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 36.00 (CH<sub>2</sub>), 45.16 (CH), 58.09 (CH), 64.84 (CH<sub>2</sub>), 124.36 (CH), 124.48 (C), 128.01, 128.11, 128.58, 128.93, 129.32 and 129.70 (CH), 130.91 (C), 135.52 (C), 140.60 (C), 143.36 (CH), 143.68 (C), 152.06 (CH), 154.98 (C).

Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O: C, 73.67; H, 5.30; N, 16.36. Found: C, 73.30; H, 5.51; N, 16.61.

**( $\pm$ )-*cis*-3-[6-(4'-Chlorophenyl)-9H-purin-9-yl]-1-indanylmethanol (10)**

The same procedure as described for **9** was used to prepare **10** from **8**; yield: 71%; mp 56–59 °C (CHCl<sub>3</sub>–hexane).

IR (KBr): 2922, 1582, 1518, 1497, 1485, 1447, 1416, 1386, 1344, 1261, 1240, 1086, 802, 757, 649 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.19–1.23 (br s, 1 H, OH, D<sub>2</sub>O exch), 2.33–2.45 (dt,  $J_{(t)} = 13.85$  Hz,  $J_{(d)} = 7.02$  Hz, 1 H, 2 $\beta$ -H), 3.05–3.17 (dt,  $J_{(t)} = 13.85$  Hz,  $J_{(d)} = 7.67$  Hz, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.59–3.64 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 3.99–4.15 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>OH), 6.28–6.35 (m, 1 H, 3 $\beta$ -H), 7.05–7.08 (d,  $J = 7.55$  Hz, 1 H, ArH), 7.26–7.47 (m, 3 H, ArH), 7.51–7.53 (d,  $J = 8.66$  Hz, 2 H, ArH), 8.12 (s, 1 H, 8'-H), 8.78–8.81 (d,  $J = 8.66$  Hz, 2 H, ArH), 8.99 (s, 1 H, 2'-H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 36.09 (CH<sub>2</sub>), 42.23 (CH), 58.26 (CH), 64.97 (CH<sub>2</sub>), 124.47, 124.58, 128.19, 128.93, 129.50 and 131.11 (CH), 131.43 (C), 134.13 (C), 137.27 (C), 140.66 (C), 143.56 (CH), 143.70 and 152.17 (C).

Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>O: C, 66.93; H, 4.55; N, 14.87. Found: C, 67.19; H, 4.76; N, 14.59.

**( $\pm$ )-*cis*-3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)methylindanol (11)**

To a suspension of diol **2** (1.6 g, 8.37 mmol) and imidazole (1.13 g, 16.74 mmol) in anhyd CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL) was added a solution of *tert*-butyldimethylsilyl chloride (1.35 g, 9.21 mmol) in anhyd CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) at 0 °C under argon. The mixture was cooled to 0–5 °C and stirred for 24 h. It was then allowed to warm up to r.t. and stirred for 1 h. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL) was added and the solution was washed with aq NaHCO<sub>3</sub> (80 mL). The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3  $\times$  50 mL) and the combined organic phases were washed with sat. aq NH<sub>4</sub>Cl (100 mL) and dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). The solvent was evaporated to give a yellow oil, which was purified by column chromatography on silica gel (84 g) using hexane–EtOAc (12:1) as eluent to give **11** as a colourless oil; yield: 1.25 g (54%).

IR (film): 3383, 3030, 2738, 1918, 1736, 1607, 1467, 1387, 1329, 1254, 1200, 1156, 1020, 968, 776, 667 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = –0.12 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>Si), –0.04 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>Si), 0.76 [s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 1.84–1.90 (m, 1 H, 2 $\beta$ -H), 2.57–2.66 (m, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.28–3.33 (m, 1 H, 3 $\beta$ -H), 3.36–3.39 (d,  $J_{(d)} = 3.45$  Hz, 1 H, D<sub>2</sub>O exch), 3.88–3.89 (d,  $J_{(d)} = 3.36$  Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>OSi), 4.99–5.05 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 7.24–7.31 (m, 3 H, ArH), 7.42–7.45 (m, 1 H, ArH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = –5.38 (CH<sub>3</sub>), –5.24 (CH<sub>3</sub>), 18.78 (C), 26.16 (CH<sub>3</sub>), 39.81 (CH<sub>2</sub>), 45.97 (CH), 67.19 (CH<sub>2</sub>), 74.98 (CH), 124.51, 125.14, 127.83 and 128.82 (CH), 144.05 (C), 146.69 (C).

Anal. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>Si: C, 69.01; H, 9.41. Found: C, 69.35; H, 9.19.

**( $\pm$ )-*trans*-3-[(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)methyl]-1-indanyl Benzoate (12)**

To a solution of **11** (1.0 g, 3.59 mmol), benzoic acid (0.62 g, 5.02 mmol), and PPh<sub>3</sub> (1.10 g, 3.95 mmol) in THF (40 mL) was added dropwise a solution of DEAD (1.56 mL) in THF (5 mL) at 0 °C under argon. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h and at r.t. for 25 h. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 mL) and sat. aq NaHCO<sub>3</sub> (60 mL) were added. The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3  $\times$  60 mL) and the solvent was removed under reduced pressure to give a colourless solid, which was purified by column chromatography on silica gel (130 g) using hexane–EtOAc (60:1) as eluent to give **12** as a colourless liquid; yield: 1.03 g (75%).

IR (film): 3068, 2857, 1603, 1462, 1351, 1175, 1109, 1024, 941, 838, 758, 712 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.01 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>Si), 0.05 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>Si), 0.89 [s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 2.33–2.51 (m, 2 H, 2 $\alpha$ -H and 2 $\beta$ -H), 3.57–3.65 (m, 1 H, 3 $\beta$ -H), 3.70–3.76 (m, 1 H, CHHOSi), 3.83–3.88 (m, 1 H, CHHOSi), 6.48–6.52 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 7.26–7.57 (m, 2 H, ArH), 8.04–8.06 (m, 2 H, ArH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = –0.51 (CH<sub>3</sub>), –4.98 (CH<sub>3</sub>), 18.68 (C), 26.29 (CH<sub>3</sub>), 36.90 (CH<sub>2</sub>), 46.11 (CH), 67.23 (CH<sub>2</sub>), 78.53 (CH), 125.10, 126.02, 127.77, 128.68, 129.28, 130.09, 130.91 and 133.27 (CH), 142.15 (C), 145.80 (C), 167.02 (C).

Anal. Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>Si: C, 72.21; H, 7.90. Found: C, 71.91; H, 8.17.

**( $\pm$ )-*trans*-3-[(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)methyl]-1-indanol (13)**

A solution of **12** (0.5 g, 1.307 mmol) and NaOMe (0.5 g, 1.43 mmol) in MeOH (20 mL) was stirred for 16 h under argon at r.t. The solvent was removed under reduced pressure to give a colourless solid, which was purified by column chromatography on silica gel (45 g) using hexane–EtOAc (18:1) as eluent to give **13** as a colourless oil; yield: 0.280 g (95%).

IR (film): 3345, 3030, 2930, 2857, 1720, 1466, 1385, 1254, 1103, 939, 837, 775 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = –0.06 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>Si), –0.09 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>Si), 0.83 [s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 2.02–2.10 (m, 1 H, 2 $\beta$ -H), 2.28–2.34 (m, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.42–3.48 (m, 1 H, 3 $\beta$ -H), 3.60–3.63 (m, 1 H, CHHO-Si), 3.70–3.74 (m, 1 H, CHHOSi), 5.26–5.29 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 7.23–7.31 (m, 3 H, ArH), 7.36–7.39 (m, 1 H, ArH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5.50 (CH<sub>3</sub>), 18.24 (C), 25.84 (CH<sub>3</sub>), 39.74 (CH<sub>2</sub>), 45.39 (CH), 66.91 (CH<sub>2</sub>), 75.45 (CH), 124.21, 124.91, 127.36 and 128.28 (CH), 144.27 (C), 145.49 (C).

Anal. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>Si: C, 69.01; H, 9.41. Found: C, 69.29; H, 9.21.

**( $\pm$ )-*cis*-3-(6-Chloro-9H-purin-9-yl)-1-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl]indan (14)**

To a solution of **13** (0.280 g, 1.006 mmol), PPh<sub>3</sub> (0.300 g, 1.107 mmol), and 6-chloropurine (0.220 g, 1.41 mmol) in THF (20 mL) was added dropwise a solution of DEAD (0.440 mL, 1.107 mmol) in THF (10 mL) at 0 °C under argon. The mixture was stirred for 1 h at 0 °C and for 39 h at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel (50 g) using hexane–EtOAc (18:1) as eluent to give **14** as a yellow oil; yield: 0.100 g (24%).

IR (film): 2928, 1562, 1391, 1254, 1066, 837, 776 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.0016–0.03 (2 s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>Si), 0.84 [s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 2.11–2.21 (dt,  $J_{(t)} = 13.65$  Hz,  $J_{(d)} = 7.36$  Hz, 1 H, 2 $\beta$ -H), 2.98–3.04 (dt,  $J_{(t)} = 13.64$  Hz,  $J_{(d)} = 8.41$  Hz, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.46–3.54 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 4.023–4.13 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>OSi), 6.31–6.34 (m, 1 H, 3 $\beta$ -H), 7.01–7.04 (d,  $J = 7.51$  Hz, 1 H, ArH), 7.26–7.47 (m, 3 H, ArH), 8.00 (s, 1 H, 8'-H), 8.79 (s, 1 H, 2'-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 26.25 ( $\text{CH}_3$ ), 37.45 ( $\text{CH}_2$ ), 45.83 ( $\text{CH}$ ), 58.69 ( $\text{CH}$ ), 66.05 ( $\text{CH}_2$ ), 124.62, 125.41, 128.44 and 129.70 ( $\text{CH}$ ), 132.14 ( $\text{C}$ ), 140.28 ( $\text{C}$ ), 144.33 ( $\text{CH}$ ), 144.95 ( $\text{C}$ ), 151.46 ( $\text{C}$ ), 152.32 ( $\text{CH}$ ), 152.47 ( $\text{C}$ ).

Anal. Calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{ClN}_4\text{OSi}$ : C, 60.78; H, 6.56; N, 13.50. Found: C, 61.09; H, 6.38; N, 13.67.

**( $\pm$ )-*cis*-3-(6-Hydroxy-9H-purin-9-yl)-1-indanylmethanol (15)**

A solution of **14** (0.060 g, 0.145 mmol) in 1,4-dioxane (15 mL) and aq. 0.25 N NaOH (8 mL) was stirred for 4 h at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and successive co-evaporations with toluene were carried out to remove any residual solvent. A colourless oil was obtained and this was purified by column chromatography on silica gel (12 g) using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (30:1) as eluent to give **15** as a colourless solid; yield: 0.030 g (73%); mp 168–170 °C.

IR (KBr): 3417, 2923, 1693, 1586, 1459, 1379, 1212, 1032, 650  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.21–2.31 (dt,  $J_{\text{H}} = 13.43$  Hz,  $J_{\text{d}} = 7.62$  Hz, 1 H, 2 $\beta$ -H), 2.93–3.03 (dt,  $J_{\text{H}} = 13.43$  Hz,  $J_{\text{d}} = 8.31$  Hz, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.45–3.49 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 3.84–3.98 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 6.16–6.21 (t,  $J_{\text{H}} = 8.01$  Hz, 1 H, 3 $\beta$ -H), 7.01–7.03 (d,  $J_{\text{d}} = 7.58$  Hz, 1 H, ArH), 7.23–7.28 (t,  $J_{\text{H}} = 7.42$  Hz, 1 H, ArH), 7.34–7.39 (t,  $J_{\text{H}} = 7.44$  Hz, 1 H, ArH), 7.46–7.49 (m, 1 H, ArH), 7.91 (s, 1 H, 2'-H), 8.05 (s, 1 H, 8'-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 37.99 ( $\text{CH}_2$ ), 46.56 ( $\text{CH}$ ), 59.77 ( $\text{CH}$ ), 65.53 ( $\text{CH}_2$ ), 66.18 ( $\text{CH}_2$ ), 125.11 ( $\text{CH}$ ), 125.30 ( $\text{C}$ ), 125.77, 128.87 and 130.11 ( $\text{CH}$ ), 140.71 ( $\text{CH}$ ), 142.19 ( $\text{C}$ ), 145.63 ( $\text{C}$ ), 146.55 ( $\text{CH}$ ), 150.45 ( $\text{C}$ ).

Anal. Calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ : C, 63.82; H, 5.00; N, 19.85. Found: C, 63.66; H, 5.24; N, 19.55.

**( $\pm$ )-*cis*-3-(6-N-Cyclopropylamino-9H-purin-9-yl)-1-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl]indan (16)**

In a pressure reactor, previously purged with argon, was placed a solution of **14** (0.100 g, 0.241 mmol) and *N*-cyclopropylamine (0.027 mL, 0.265 mmol) in THF (15 mL) and the mixture was stirred for 150 h at 50 °C. The solvent was removed under reduced pressure to give a yellow oil, which was purified by column chromatography on silica gel (8 g) using  $\text{CHCl}_3$ -*i*-PrOH (60:1) as eluent to give **16** as a yellow oil; yield: 0.070 g (67%).

IR (film): 3387, 1732, 1560, 1350, 1242, 1066  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = -0.01 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ), 0.03 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ), 0.83 [s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ], 1.03–1.05 [m, 4 H, ( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub> of *c*-Pr], 2.08–2.18 (dt,  $J_{\text{H}} = 13.71$  Hz,  $J_{\text{d}} = 7.10$  Hz, 1 H, 2 $\beta$ -H), 2.97–3.07 (dt,  $J_{\text{H}} = 13.71$  Hz,  $J_{\text{d}} = 8.43$  Hz, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.45–3.54 (m, 3 H, 1 $\beta$ -H + 1 $\alpha$ -H + CH of *c*-Pr), 3.87–3.92 (part A of an ABM system,  $J_{\text{A,B}} = 11.13$  Hz,  $J_{\text{A,M}} = 5.28$  Hz, 1 H, CHHOSi), 3.92–3.97 (part B of an ABM system,  $J_{\text{B,A}} = 11.13$  Hz,  $J_{\text{B,M}} = 5.27$  Hz, 1 H, CHHOSi), 6.18–6.23 (t,  $J_{\text{H}} = 7.62$  Hz, 1 H, 3 $\beta$ -H), 7.04–7.07 (d,  $J_{\text{d}} = 7.56$  Hz, 1 H, ArH), 7.29–7.42 (m, 3 H, ArH), 7.67 (s, 1 H, 2'-H), 7.82 (s, 1 H, 8'-H), 8.31 (br s, 1 H, NH,  $\text{D}_2\text{O}$  exch).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 25.82 ( $\text{CH}_2$ ), 26.09 ( $\text{CH}_3$ ), 37.07 ( $\text{CH}_2$ ), 45.45 ( $\text{CH}_3$ ), 58.36 ( $\text{CH}_2$ ), 65.59 ( $\text{CH}$ ), 124.25, 124.44, 125.01 and 125.34 (ArH), 128.06 ( $\text{CH}$ ), 128.20 ( $\text{C}$ ), 129.44 ( $\text{CH}$ ), 129.61 ( $\text{C}$ ), 137.37 ( $\text{C}$ ), 154.35 ( $\text{C}$ ).

Anal. Calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{OSi}$ : C, 66.17; H, 7.64; N, 16.08. Found: C, 65.81; H, 7.45; N, 16.38.

**( $\pm$ )-*cis*-3-(6-N-Cyclopropylamino-9H-purin-9-yl)-1-indanylmethanol (17)**

To a solution of **16** (0.06 g, 0.147 mmol) in THF (10 mL) was added a mixture of TFA- $\text{H}_2\text{O}$  (3:1) (6 mL) and the mixture was stirred for 21 h at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and

several co-evaporations with toluene were carried out to remove residual solvent. A yellow oil was obtained and this was purified by column chromatography on silica gel (5 g) using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -*i*-PrOH (30:1) as eluent to give **17** as a colourless solid; yield: 0.020 g (42%); mp 187–190 °C.

IR (KBr): 3394, 1618, 1458, 1198, 1038, 785, 649  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.85–0.97 [m, 4 H, ( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub> of *c*-Pr], 2.30–2.40 (dt,  $J_{\text{H}} = 13.94$  Hz,  $J_{\text{d}} = 7.00$  Hz, 1 H, 2 $\beta$ -H), 2.99–3.10 (dt,  $J_{\text{H}} = 13.94$  Hz,  $J_{\text{d}} = 8.87$  Hz, 1 H, 2 $\alpha$ -H), 3.14 (m, 1 H, CH of *c*-Pr), 3.51–3.59 (m, 1 H, 1 $\beta$ -H), 3.98–4.04 (part A of an ABM system,  $J_{\text{A,B}} = 10.90$  Hz,  $J_{\text{A,M}} = 4.03$  Hz, 1 H, CHHOH), 4.06–4.11 (part B of an ABM system,  $J_{\text{B,A}} = 10.90$  Hz,  $J_{\text{B,M}} = 4.65$  Hz, 1 H, CHHOH), 6.12–6.17 (t,  $J_{\text{H}} = 7.85$  Hz, 1 H, 3 $\beta$ -H), 6.24–6.29 (t,  $J_{\text{H}} = 5.89$  Hz, 1 H, 3 $\alpha$ -H), 7.02–7.05 (d,  $J_{\text{d}} = 7.60$  Hz, 1 H, ArH), 7.22–7.31 (m, 1 H, ArH), 7.36–7.47 (m, 2 H, ArH), 7.74 (s, 1 H, 8'-H), 8.39 (s, 1 H, 2'-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.51 ( $\text{CH}_2$ ), 29.76 ( $\text{CH}$ ), 36.08 ( $\text{CH}_2$ ), 45.37 ( $\text{CH}$ ), 58.48 ( $\text{CH}$ ), 64.97 ( $\text{CH}_2$ ), 119.96 ( $\text{C}$ ), 124.62, 125.07, 128.10 and 129.41 ( $\text{CH}$ ), 138.67 ( $\text{C}$ ), 139.38 ( $\text{C}$ ), 140.90 ( $\text{CH}$ ), 143.81 ( $\text{CH}$ ), 144.37 ( $\text{C}$ ).

Anal. Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}$ : C, 67.27; H, 5.96; N, 21.79. Found: C, 67.45; H, 6.19; N, 21.46.

**( $\pm$ )-*cis*-5-Chloro-1-(3-hydroxymethyl-1-indanyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidino-2,4-dione (19)**

A solution of **18**<sup>16</sup> (32 mg, 0.124 mmol) and NCS (17.5 mg, 0.129 mmol) in DMF (10 mL) was stirred for 1 h at r.t. under argon. The DMF was removed under reduced pressure with the aid of repeated co-evaporations with toluene. The residue was purified by column chromatography on silica gel (16 g), using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (40:1) as eluent to give **19** as a colourless solid; yield: 15 mg (25%); mp 248 °C (dec.).

IR (KBr): 3546, 3262, 3036, 1689, 1454, 1376, 1259, 1069, 766  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  = 1.86–1.98 (dt,  $J_{\text{H}} = 13.67$  Hz,  $J_{\text{d}} = 7.55$  Hz, 1 H, 2' $\beta$ -H), 2.76–2.89 (dt,  $J_{\text{H}} = 13.67$  Hz,  $J_{\text{d}} = 8.59$  Hz, 1 H, 2' $\alpha$ -H), 3.30–3.39 (m, 1 H, 3' $\beta$ -H), 3.85–3.91 (part A of an ABM system,  $J_{\text{A,B}} = 10.96$  Hz,  $J_{\text{A,M}} = 4.29$  Hz, 1 H, CHHO), 3.94–4.01 (part B of an ABM system,  $J_{\text{B,A}} = 10.96$  Hz,  $J_{\text{B,M}} = 4.79$  Hz, 1 H, CHHO), 4.65–5.01 (s, 1 H, OH,  $\text{D}_2\text{O}$  exch), 6.07–6.14 (t,  $J_{\text{H}} = 7.99$  Hz, 1 H, 1' $\beta$ -H), 7.13–7.16 (d,  $J = 7.21$  Hz, 1 H, ArH), 7.28–7.46 (m, 3 H, ArH), 7.58 (s, 1 H, 6-H), 11.65–12.09 (s, 1 H, NH,  $\text{D}_2\text{O}$  exch).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  = 34.75 ( $\text{CH}_2$ ), 44.52 ( $\text{CH}$ ), 59.02 ( $\text{C}$ ), 63.57 ( $\text{CH}_2$ ), 107.25 ( $\text{C}$ ), 124.33, 124.97, 127.78 and 128.90 ( $\text{CH}$ ), 139.80 ( $\text{CH}$ ), 140.99 ( $\text{C}$ ), 145.66 ( $\text{C}$ ), 150.92 ( $\text{C}$ ), 159.55 ( $\text{C}$ ).

Anal. Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_3$ : C, 57.44; H, 4.48; N, 9.57. Found: C, 57.67; H, 4.73; N, 9.69.

**( $\pm$ )-*cis*-5-Bromo-1-(3-hydroxymethyl-1-indanyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidino-2,4-dione (20)**

The same procedure as described for **19** was used to prepare compound **20** from **18** by reaction with NBS; yield: 73%; mp 246 °C (dec.).

IR (KBr): 3037, 1858, 1687, 1502, 1446, 1326, 1262, 910, 768  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  = 1.83–1.94 (dt,  $J_{\text{H}} = 13.68$  Hz,  $J_{\text{d}} = 7.52$  Hz, 1 H, 2' $\beta$ -H), 2.72–2.84 (dt,  $J_{\text{H}} = 13.68$  Hz,  $J_{\text{d}} = 8.60$  Hz, 1 H, 2' $\alpha$ -H), 3.27–3.34 (m, 1 H, 3' $\beta$ -H), 3.81–3.87 (part A of an ABM system,  $J_{\text{A,B}} = 10.98$  Hz,  $J_{\text{A,M}} = 4.16$  Hz, 1 H, CHHO), 3.90–3.97 (part B of an ABM system,  $J_{\text{B,A}} = 10.98$  Hz,  $J_{\text{B,M}} = 4.72$  Hz, 1 H, CHHO), 6.03–6.10 (t,  $J_{\text{H}} = 7.96$  Hz, 1 H, 1' $\beta$ -H), 7.09–7.12 (d,

$J = 7.45$  Hz, 1 H, ArH), 7.24–7.42 (m, 3 H, ArH), 7.63 (s, 1 H, 6-H), 11.90–12.03 (s, 1 H, NH, D<sub>2</sub>O exch).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 34.74$  (CH<sub>2</sub>), 44.52 (CH), 59.02 (CH<sub>2</sub>), 63.51 (CH), 95.48 (C), 123.98, 124.64, 127.45 and 128.57 (CH), 140.69 (C), 141.88 (CH), 145.33 (C), 150.78 (C), 159.35 (C).

Anal. Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 49.87; H, 3.89; N, 8.31. Found: C, 50.11; H, 3.71; N, 8.46.

**(±)-cis-5-Iodo-1-(3-hydroxymethyl-1-indanyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidino-2,4-dione (21)**

A solution of **18** (32 mg, 0.124 mmol) and NIS (27 mg, 0.129 mmol) in AcOH (10 mL) was stirred for 36 h at r.t. under argon. The AcOH was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in aq 0.5 M NaOH (5 mL) and neutralised with aq 0.5 M HCl. The material was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel (11 g), using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (25:1) as eluent to give **21** as a colourless solid; yield: 25 mg (60%); mp 225–227 °C.

IR (KBr): 3505, 1681, 1492, 1443, 1327, 1261, 1025, 911, 756 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 1.75$ –1.86 (dt,  $J_{(0)} = 13.45$  Hz,  $J_{(d)} = 7.61$  Hz, 1 H, 2'β-H), 2.54–2.66 (dt,  $J_{(0)} = 13.45$  Hz,  $J_{(d)} = 8.63$  Hz, 1 H, 2'α-H), 3.21–3.39 (m, 1 H, 3'β-H), 3.70 (br s, 2 H, CH<sub>2</sub>OH), 4.75 (s, 1 H, OH, D<sub>2</sub>O exch), 5.87–5.93 (t,  $J_{(0)} = 8.07$  Hz, 1 H, 1'β-H), 7.06–7.09 (d,  $J = 7.25$  Hz, 1 H, ArH), 7.17–7.29 (m, 2 H, ArH), 7.34–7.37 (d,  $J = 7.25$  Hz, 1 H, ArH), 7.61 (s, 1 H, 6-H), 10.80 (s, 1 H, NH, D<sub>2</sub>O exch).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 35.08$  (CH<sub>2</sub>), 44.87 (CH), 59.21 (CH), 63.79 (CH<sub>2</sub>), 69.49 (C), 124.20, 124.97, 127.75 and 128.85 (CH), 141.09 (C), 145.63 (C), 146.82 (CH), 151.43 (C), 160.98 (C).

Anal. Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 43.77; H, 3.41; N, 7.29. Found: C, 44.01; H, 3.59; N, 7.13.

## Acknowledgment

The authors thank the Xunta de Galicia for financial support of this work under projects PGIDT05PXIB20301PR and 07CSA008203PR.

## References

- (1) Part of this work was presented at the XIV Congreso Nacional of The Sociedad Española de Química Terapéutica, Bilbao: Spain, September 2005.
- (2) For recent reviews on carbanucleosides, see: (a) Rodríguez, J. B.; Comin, M. J. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 95. (b) Ichikawa, E.; Kato, K. *Curr. Top. Med. Chem.* **2001**, *8*, 385. (c) Zhu, X.-F. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 651. (d) Ferrero, M.; Gotor, V. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4319. (e) Agrofoglio, L.; Challand, S. R. *Acyclic, Carbocyclic and L-Nucleosides*; Kluwer Academic: Dordrecht, **1998**.
- (3) (a) Roberts, S.; Biggadike, K.; Borthwick, A. D.; Kirk, B. *Topics in Medicinal Chemistry*; Leeming, P. R., Ed.; Royal Society of Chemistry: London, **1988**. (b) Marquez, V. E.; Lim, M. *Med. Res. Rev.* **1986**, *6*, 1. (c) Saunders, J.; Cameron, J. M. *Med. Res. Rev.* **1995**, *15*, 497.
- (4) (a) Vince, R.; Hua, M.; Brownell, J.; Daluge, S.; Lee, F.; Shannon, W. M.; Lavelle, G. C.; Qualls, J.; Weislow, O. S.; Kiser, R.; Canonico, P. G.; Schultz, R. H.; Narayanan, V. L.; Mayo, J. G.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *156*, 1046. (b) Vince, R.; Hua, M. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 17. (c) Vince, R.; Peterson, M. L.; Lackey, J. W.; Mook, R. A.; Partridge, J. J. *PCT Int. Appl. WO 9115490*, **1991**; *Chem. Abstr.* **1992**, *116*, 59910.
- (5) (a) Daluge, S. M.; Good, S. S.; Faletto, M. B.; Miller, W. H.; St. Clair, M. H.; Boone, L. R.; Tisdale, M.; Parry, N. R.; Reardon, J. E.; Dornsife, R. E.; Averett, D. R.; Krenitsky, T. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1082. (b) Crimmins, M. T.; King, B. W. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4192. (c) Foster, R. H.; Faulds, D. *Drugs* **1998**, *55*, 729.
- (6) (a) Fernández, F.; García-Mera, X.; Morales, M.; Rodríguez-Borges, J. E.; De Clercq, E. *Synthesis* **2002**, 1084. (b) Yao, S.-W.; López, V. H. C.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Morales, M.; Rodríguez-Borges, J. E.; Cordeiro, M. N. D. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4999.
- (7) (a) Fernández, F.; García-Mera, X.; Morales, M.; Vilariño, L.; Caamaño, O.; De Clercq, E. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9245. (b) Fernández, F.; García-Mera, X.; López, C.; Morales, M.; Rodríguez-Borges, J. E. *Synthesis* **2005**, 3549.
- (8) Thomas, S.; McDowall, J. E.; Cheah, V.; Bye, A.; Segal, M. B. *The Entry of Abacavir into the Guinea-Pig Brain: Comparison with other Reverse Transcriptase Inhibitors*; 12th World AIDS Conference: Geneva, **1998**.
- (9) (a) Cheson, B. D. *Hematol. Cell. Ther.* **1996**, *38* (Suppl. 2), 109. (b) Bergmann, L. *Leukemia* **1997**, *11* (Suppl. 2), 29. (c) Hocek, M.; Hol, A.; Votruba, I.; Dvoráková, H. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1817.
- (10) Grunewald, G. L.; Sall, D. J.; Monn, J. A. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 433.
- (11) Fernández, F.; García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 365.
- (12) (a) Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1. (b) Hughes, D. L. *Org. React.* **1992**, *42*, 335. (c) Lawrence, S. *PharmaChem* **2002**, *1*, 12. (d) But, T. Y. S.; Toy, P. H. *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1340.
- (13) (a) Hocek, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 245. (b) Havelková, M.; Dvorák, D.; Hocek, M. *Synthesis* **2001**, 1704. (c) Havelková, M.; Hocek, M.; Cesnek, M.; Dvorák, D. *Synlett* **1999**, 1145.
- (14) (a) Hocek, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 245. (b) Hocek, H.; Hockova, D.; Stambasky, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2003**, *68*, 837. (c) Hocek, H.; Holy, A.; Votruba, I.; Dvorakova, H. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1817. (d) Havelková, M.; Hocek, M.; Cesnek, M.; Dvorák, D. *Synlett* **1999**, 1145.
- (15) Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190.
- (16) Fernández, F.; García-Mera, X.; Morales, M.; Rodríguez-Borges, J. E. *Synthesis* **2001**, 239.
- (17) (a) Sako, M.; Saito, T.; Kameyama, K.; Hirota, K.; Maki, Y. *Synthesis* **1987**, 829. (b) Srivastavam, P. C.; Nagpal, K. L. *Experientia* **1970**, *26*, 220.
- (18) De Clercq, E. *In Vivo and Ex Vivo Text Systems to Rationalize Drug Design and Delivery*; Cromelin, D.; Couvreur, P.; Duchene, D., Eds.; Editions de Santé: Paris, **1994**.



# MIND-BEST: Web Server for Drugs and Target Discovery; Design, Synthesis, and Assay of MAO-B Inhibitors and Theoretical–Experimental Study of G3PDH Protein from *Trichomonas gallinae*

Humberto González-Díaz,<sup>\*,†</sup> Francisco Prado-Prado,<sup>‡</sup> Xerardo García-Mera,<sup>‡</sup> Nerea Alonso,<sup>‡</sup> Paula Abeijón,<sup>‡</sup> Olga Caamaño,<sup>‡</sup> Matilde Yáñez,<sup>§</sup> Cristian R. Munteanu,<sup>\*,||</sup> Alejandro Pazos,<sup>||</sup> María Auxiliadora Dea-Ayuela,<sup>⊥</sup> María Teresa Gómez-Muñoz,<sup>||</sup> M. Magdalena Garijo,<sup>||</sup> José Sansano,<sup>||</sup> and Florencio M. Ubeira<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Department of Microbiology and Parasitology, <sup>‡</sup>Department of Organic Chemistry, and <sup>§</sup>Department of Pharmacology, University of Santiago de Compostela, 15782, Spain

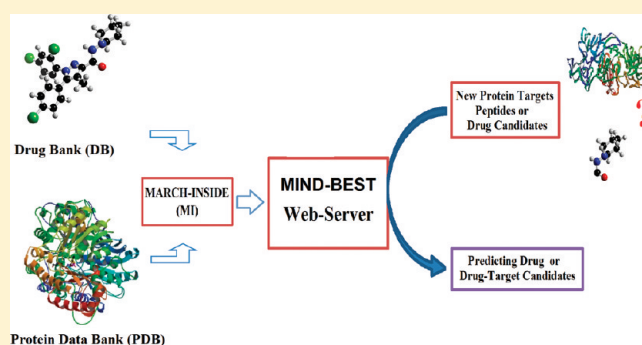
<sup>||</sup>Department of Information and Communication Technologies, Computer Science Faculty, University of A Coruña, Campus de Elviña, 15071, A Coruña, Spain

<sup>⊥</sup>Department of Chemistry, Biochemistry and Molecular Biology, and <sup>||</sup>Department of Animal Health and Production, University Cardenal Herrera-CEU, 46113-Moncada, Valencia, Spain

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** Many drugs with very different affinity to a large number of receptors are described. Thus, in this work, we selected drug–target pairs (DTPs/nDTPs) of drugs with high affinity/nonaffinity for different targets. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) models become a very useful tool in this context because they substantially reduce time and resource-consuming experiments. Unfortunately, most QSAR models predict activity against only one protein target and/or they have not been implemented on a public Web server yet, freely available online to the scientific community. To solve this problem, we developed a multitarget QSAR (mt-QSAR) classifier combining the MARCH-INSIDE software for the calculation of the structural parameters of drug and target with the linear discriminant analysis (LDA) method in order to seek the best model. The accuracy of the best LDA model was 94.4% (3,859/4,086 cases) for training and 94.9% (1,909/2,012 cases) for the external validation series. In addition, we implemented the model into the Web portal Bio-AIMS as an online server entitled MARCH-INSIDE Nested Drug-Bank Exploration & Screening Tool (MIND-BEST), located at <http://miaja.tic.udc.es/Bio-AIMS/MIND-BEST.php>. This online tool is based on PHP/HTML/Python and MARCH-INSIDE routines. Finally, we illustrated two practical uses of this server with two different experiments. In experiment 1, we report for the first time a MIND-BEST prediction, synthesis, characterization, and MAO-A and MAO-B pharmacological assay of eight rasagiline derivatives, promising for anti-Parkinson drug design. In experiment 2, we report sampling, parasite culture, sample preparation, 2-DE, MALDI-TOF and -TOF/TOF MS, MASCOT search, 3D structure modeling with LOMETS, and MIND-BEST prediction for different peptides as new protein of the found in the proteome of the bird parasite *Trichomonas gallinae*, which is promising for antiparasite drug targets discovery.

**KEYWORDS:** Drug–protein interaction, protein structure complex networks, *Trichomonas gallinae* proteome, rasagiline inhibitors of MAO enzymes, multitarget QSAR, Markov model



The fast and accurate prediction of interactions between drugs and target proteins is a keystone in the combination of bioinformatics and proteome research toward drug discovery. Therefore, there is a strong incentive to develop new methods capable of detecting these potential drug–target interactions efficiently.<sup>1</sup> In this sense, graph and complex network theory may play an important role in different stages of the modeling process

with different levels of organization of matter.<sup>2–9</sup> In a first stage, we can use molecular graphs to represent and calculate structural parameters for drugs called topological indices (TIs) and also to estimate physicochemical parameters based on a graph method

**Received:** October 5, 2010

**Published:** December 27, 2010

(see our recent reviews<sup>10</sup>). At a higher level we can use graphs to represent the structure of the drug target proteins and to calculate characteristic TIs and/or physicochemical parameters of protein structure or protein interaction networks (see for instance the works carried out by Giuliani et al.<sup>11–17</sup> or our recent review<sup>18</sup>). Next, we can use TIs and/or physicochemical parameters as inputs/outputs to study the dynamics and other properties of networks. We can also use TIs to search for classifiers able to predict molecular structures (drugs, RNAs, proteins) that present a specific property or not (see for instance the works achieved by Bonchev<sup>19–23</sup> and Zbilut et al.<sup>24,25</sup>). In particular, using the drug and target parameters we can discriminate between drug–target pairs of drugs with high affinity (DTPs) and those pairs of drugs with no affinity for different targets (nDTPs).

In general, this technique lies within the kind of studies called quantitative structure–activity relationship (QSAR) models and may become a very useful tool in this context because they substantially reduce time and resource-consuming experiments. Almost all QSAR techniques are based on the use of molecular descriptors, which are numerical series that codify useful chemical information and enable correlations between statistical and biological properties.<sup>26–29</sup> The intensive activity in the field has prompted many authors to publish recent reviews and/or assemble full special issues in high impact journals. For instance, author González-Díaz guest-edited hot-topic issues with papers of different groups that review the use of these methods in protein and proteomics,<sup>11,18,30–34</sup> medicinal chemistry,<sup>35–44</sup> drug ADMET processes and metabolomics,<sup>45–53</sup> or pharmaceutical design.<sup>54–63</sup> In a last step, the prediction of all possible DTPs/nDTPs in the global set of relationships between protein targets and all drugs makes up the complex network of drugs and/or targets. For instance, Yildirim et al.<sup>64</sup> built a bipartite graph consisting of U.S. Food and Drug Administration-approved drugs and proteins linked by drug–target binary associations. The resulting network connects most drugs into a highly interlinked giant component, with strong local clustering of drugs of similar types according to anatomical therapeutic chemical classification. Topological analyses of this network quantitatively showed an overabundance of “follow-on” drugs, that is, drugs that target already targeted proteins.

In a previous work, our group has reported a QSAR model based on the MARCH-INSIDE method to predict a large network of DTPs.<sup>65</sup> However, even though this model is useful to predict targets for many proteins, it has no availability for public research because it is not implemented on an online web server. The problem with many QSAR models is more serious because many of them work for only one target protein or for a limited family of organic compounds. Therefore, we have developed new statistical methods to predict simultaneously on a large scale unknown DTPs derived from chemical structure and 3D structure of target proteins. In principle, we can select between more than 1,600 different molecular descriptors to solve the former problem.<sup>66</sup> However, there are few methods that offer one unique software platform to calculate parameters for both drugs and protein structures based on unified theoretical background more easily to rationalize. Our group has introduced elsewhere a Markov chain model (MCM) method named MARKOV CHAINS Invariants for Network SIMulation and Design (MARCH-INSIDE). The MARCH-INSIDE approach makes use of the same MCM theoretical formulation to calculate the average values of different molecular TIs and physicochemical properties from 2D, 3D, and/or sequence chemical structures including drugs, DNA, RNA, and proteins (see a recent review<sup>36</sup>). MARCH-INSIDE

parameters not only offer these advantages but also may be used as inputs to train LDA models with the software STATISTICA.<sup>32,67–71</sup>

In this work, we developed a multitarget QSAR (mt-QSAR) classifier using the MARCH-INSIDE technique to calculate the structural parameters of drug and target, and LDA to search for the best model. The validation of the model was carried out by means of external predicting series. We implemented the present model into the Bio-AIMS Web portal as an online server entitled MARCH-INSIDE Nested Drug-Bank Exploration & Screening Tool (MIND-BEST), available at <http://miaja.tic.udc.es/Bio-AIMS/MIND-BEST.php>. This online free public tool is based on PHP/HTML/Python and MARCH-INSIDE routines. Finally, we illustrate two practical uses of this server by two different experiments. In experiment 1, we report for the first time a MIND-BEST prediction, synthesis, characterization, and MAO-A and MAO-B pharmacological assay of eight rasagiline derivatives. In experiment 2, we report parasite culture, sample preparation, 2-DE, MALDI-TOF and -TOF/TOF MS, MASCOT search, modeling of peptide 3D structure with LOMETS (LOCAL METa-Threading-Server),<sup>72</sup> and MIND-BEST prediction for different peptides as new protein found in the proteome of the bird parasite *Trichomonas gallinae* (*T. gallinae*). In Figure 1 we depict a flowchart with the main steps given in this work to train and validate the LDA classifier as well as implement it into the MIND-BEST server.

## MATERIALS AND METHODS

### Computational Methods

#### MARCH-INSIDE Technique

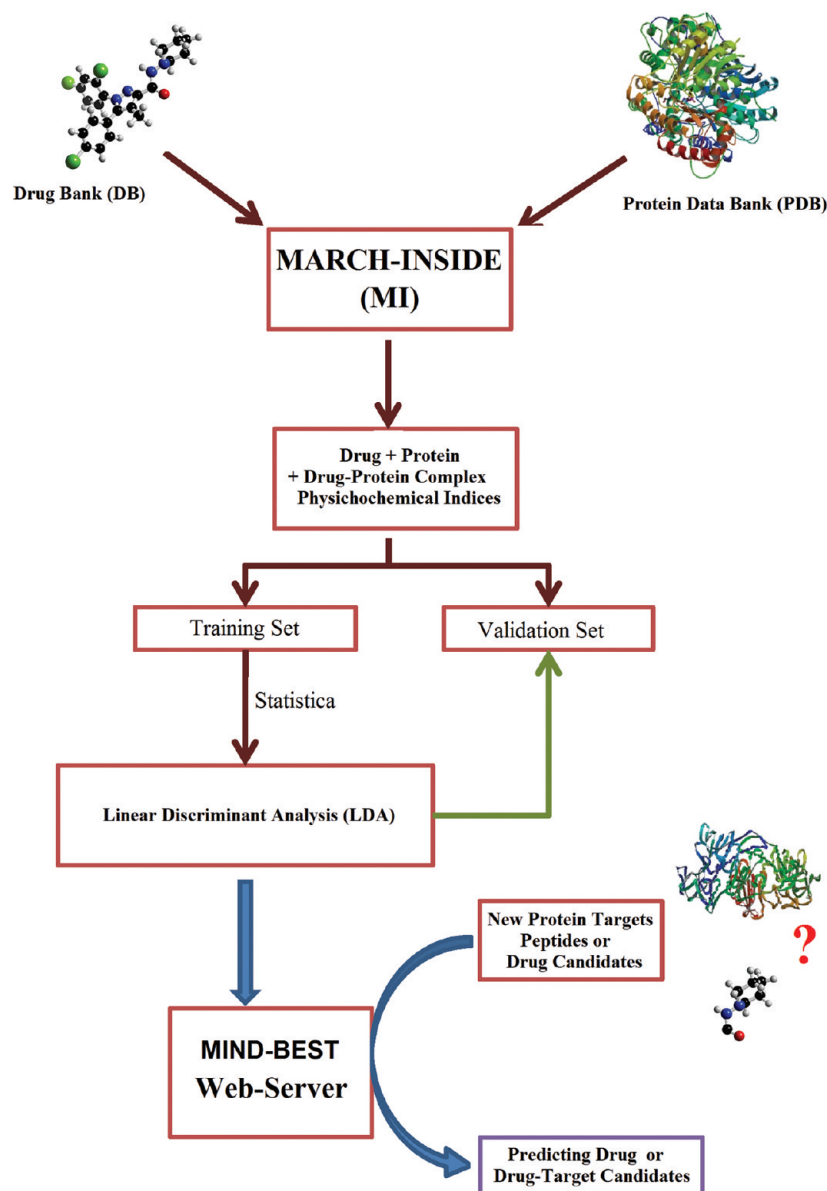
**Parameters for Drugs.** The MARCH-INSIDE approach<sup>10,29,36</sup> is based on the calculation of the different physicochemical molecular properties as an average of atomic properties (ap). For instance, it is possible to derive average estimations from molecular descriptors or group indices such as electro-negativities  ${}^k\chi(G)$ <sup>73,74</sup> values.

$${}^k\chi(G) = \sum_{j \in G} p_k(\chi_j) \cdot \chi_j \quad (1)$$

It is possible to consider isolated atoms ( $k = 0$ ) in the estimation of the molecular properties  ${}^0\chi(G)$ . In this case, the probabilities  ${}^0p(\chi_j)$  are determined without considering the formation of chemical bonds (simple additive scheme). However, it is possible to consider the gradual effects of the neighboring atoms at different distances in the molecular backbone. In order to reach this goal, the method uses an MCM, which determines the absolute probabilities  $p_k(\chi_j)$  with which the atoms placed at different distances  $k$  affect the contribution of the atom  $j$  to the molecular property in question. For a detailed description, see online Supporting Information file SM1.doc.

**Parameters for Proteins.** In previous works, we have predicted a protein function based on 3D potentials for different types of interactions. The main types of potentials used are the averaged values of electrostatic, van der Waals (vdW), and HINT potentials.<sup>75,76</sup> In this paper, we used only the electrostatic  $\xi_k$  and HINT potentials  $\mu_k$ . We omitted vdW since the HINT potential includes a vdW component. The values were used as inputs to construct the QSAR model. The detailed explanation of the procedure has been published before (see also method Supporting Information for details) and therefore we only provide the most general formula for these potentials and some general





**Figure 1.** Flowchart of all steps given in this work to develop the MIND-BEST server.

explanations:<sup>29</sup>

$$\xi_k(R) = \sum_{j=1 \in R}^n p_k(j) \cdot \xi(j) \quad (2)$$

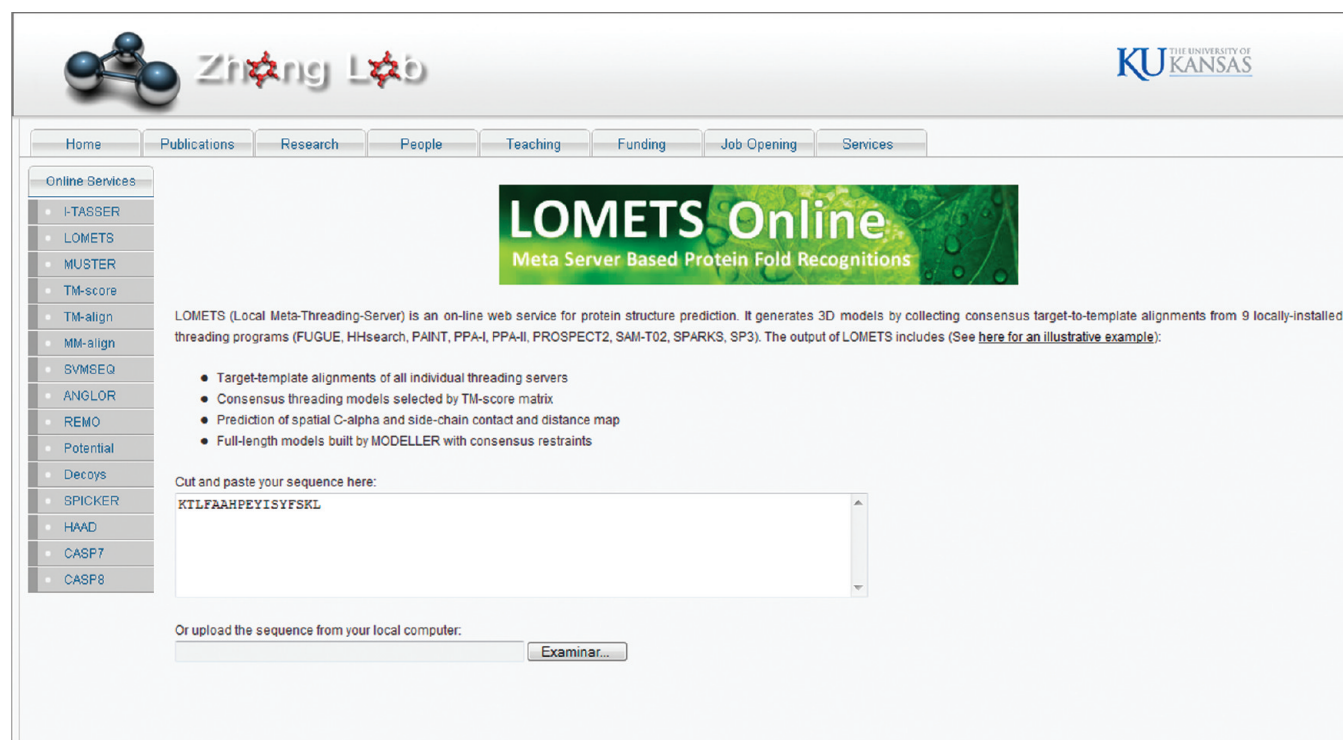
The average general potentials depend on the absolute probabilities  $p_k(j)$  and the total potential with which the  $j$ th amino acid interacts with the rest of amino acids. These are the probabilities with which the amino acids interact with other amino acids placed at a topological distance  $d_{ij}$  equal to  $k$  times the cutoff distance ( $d_{ij} = k \cdot r_{\text{cutoff}}$ ). The method uses an MCM to calculate these probabilities, which also depend on the 3D interactions between all pairs of amino acids placed at distance  $r_{ij}$  in  $r_3$  in the protein structure. Depending on the coordinate  $r_3 = (x, y, z)$  of the  $\alpha$  carbon ( $C_\alpha$ ) of any amino acid, it may lie within one of four different protein regions: core, inner, middle, and surface. These regions are defined as spheres with center in the origin of coordinates  $r_3 = (0, 0, 0)$  of the PDB and radius  $r \leq 25\%$ ,  $25\% < r \leq 50\%$ ,  $50\% < r \leq 75\%$ , or  $75\% < r \leq 100\%$  of the  $r_{\text{max}}$  for

all  $C_\alpha$  in the PDB (for a detailed description see online Supporting Information file SM1.doc).

**Statistical Analysis.** We used  $^k\chi(G)$  drug molecular descriptors and  $^k\xi(R)$  receptor or drug target descriptors for different drugs ( $d$ ) with different receptor, and we attempted to develop a simple linear classifier of mt-QSAR type with the general formula:

$$S(\text{DTP})_{\text{pred}} = \sum_{k=0}^5 b(G_k) \cdot ^k\chi(G) + \sum_{k=0}^5 b(R_k) \cdot ^k\xi(R) + b \quad (3)$$

We used the linear discriminating analysis (LDA) method to fit this discriminant function. The model deals with the classification of a compound set with or without affinity on different receptors. The dummy variable affinity class (AC) was used as input to codify the affinity. This variable indicates either high ( $AC = 1$ ) or low ( $AC = 0$ ) affinity of the drug by the receptor.  $S(\text{DTP})_{\text{pred}}$ , or DTP affinity predicted score, is the output of the model and is a continuous dimensionless score that sorts compounds out from low to high affinity to the target, coinciding



**Figure 2.** Snapshot of LOMETS server used to predict 3D structure of peptides.

DTPs with higher values of  $S(\text{DTP})_{\text{pred}}$  and nDTPs with lower values. In eq 3,  $b$  represents the coefficients of the classification function, determined by the LDA module of the STATISTICA 6.0 software package.<sup>77</sup> We used a forward-stepwise algorithm for a variable selection. The statistical significance of the LDA model was determined by calculating the  $p$ -level ( $p$ ) of error with the Chi-square test. We also checked the specificity, sensitivity, and total accuracy to determine the quality-of-fit to data in training. The validation of the model was corroborated with external prediction series.

**Data Set.** The data were obtained from a public and online available source, known as the Drug Bank (DB, <http://www.drugbank.ca/>). From this site we obtained a list of all drugs approved by the U.S. Food and Drug Administration (US FDA, <http://www.fda.gov/>). We only included DTPs with known affinity of drugs by target with a known 3D structure available in the Protein Data Bank (PDB, <http://www.pdb.org/>).<sup>78</sup> The data set contains more than 300 drugs with their respective 323 molecular targets. The data also contain negative cases made up of active compounds for known targets but not marketed as active against other targets (nDTPs). Therefore, we were able to collect over 6,098 cases (DTPs/nDTPs). The names, DB codes, SMILE codes, target function, and target PDB codes for all drugs and targets are depicted in Supporting Information file SM2.pdf due to space constraints.

#### Theoretical Study of Protein Fingerprints

**LOMETS Study.** LOMETS is a locally installed meta-server method for protein structure prediction (Figure 2). It generates protein structure predictions by ranking and selecting models from eight state-of-the-art threading programs. LOMETS implementation, validation, and use have been published previously.<sup>72</sup> Consequently, it is worth mentioning some important details. Spatial restraints are combined from the consensus of the top 20 threading alignments. The model ranking scheme of LOMETS is the

following: for a given target, 160 models are generated by 8 component servers in which each server generates 20 models as sorted by their Z-scores in each algorithm; the best 10 models are finally selected from 160 models on the basis of the following scoring function:

$$\text{score}(i, j) = (Z(i, j) / Z_0(i)) \cdot \text{conf}(i) + \text{seq-id}(i, j) \quad (4)$$

where  $Z(i, j)$  is the Z-score of  $j$ th model of  $i$ th server,  $Z_0(i)$  is the cutoff of  $i$ th server,  $\text{conf}(i)$  is the confidence of  $i$ th server, which is defined as the average TM score to native of all predictions in a large-scale benchmark test.  $\text{Seq-id}(i, j)$  is the sequence identity to query of  $j$ th model of  $i$ th server. We list as follows the parameters  $Z_0(i)$  ( $\text{conf}(i)$ ) for each Server ( $i$ ): 1-FUGUE 7.0 (0.383),<sup>79</sup> 2-HHsearch 9.5 (0.439),<sup>80</sup> 3-MUSTER 5.8 (0.454),<sup>81</sup> 4-PROSPECT 23.2 (0.446),<sup>82</sup> 5-PPA-I 9.3 (0.447),<sup>72</sup> 6-SAM 9.5 (0.377),<sup>83</sup> 7-SP 37.0 (0.437),<sup>84</sup> and 8-SPARKS 7.0 (0.429).<sup>85</sup> Finally, the models are ranked based on TM score, i.e., from the models with higher average TM score to the other models ranked higher.<sup>72</sup> LOMETS also considers the following format of spatial restraints:

1. Side-chain contacts: describes the predicted side chain contacts between pairs of residues. First line indicates the total number of pairs of predicted side chain contacts. Columns 1 and 2 are residue orders of predicted pairs. Column 3 is the confidence of the contact, which is defined as the relative frequency of contacts appearing in the top 20 templates.
2.  $C_\alpha$  atom contacts: describes the predicted  $C_\alpha$  atom contacts between pairs of residues. First line describes the total number of pairs of predicted  $C_\alpha$  contacts. Columns 1 and 2 are residue orders of predicted pairs. Column 3 is the confidence of contact predictions.
3. Short-range  $C_\alpha$  distances: describes the predicted  $C_\alpha$  short-range distances, i.e.,  $|i - j| < 7$ . First line is the total number of short-range  $C_\alpha$  atom pairs. Columns 1 and 2 are residue

orders of predicted pairs. Column 4 is the predicted distance between the  $C_\alpha$  atom pairs. Column 5 is the standard deviation of the distance predictions. The unit of distance is angstrom.

- Long-range  $C_\alpha$  distances: describes the predicted  $C_\alpha$  long-range distances, i.e.,  $|i - j| > 6$ . First line describes the total number of long-range  $C_\alpha$  atom pairs. Columns 1 and 2 are residue orders of predicted pairs. Column 3 is the predicted distance between  $C_\alpha$  atom pairs. There are up to 4 values of distances for each pair, which are taken from the top 4 template alignments.

## Experimental Methods

### Study of Rasagiline Analogues (Experiment 1)

**Identification.** Melting points are uncorrected and were determined in Reichert Kofler Thermopan or in capillary tubes on a Büchi 510 apparatus. Infrared spectra were recorded on a Perkin-Elmer 1640-FT spectrophotometer.  $^1\text{H}$  NMR spectra (300 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra (75 MHz) were recorded in a Bruker AMX spectrometer, using TMS as internal reference (chemical shifts in  $\delta$  values,  $J$  in Hz). Mass spectra were recorded on a HP5988A spectrometer. FABMS were obtained using Micromass Autospec mass spectrometer. Microanalyses were performed in a Perkin-Elmer 240B elemental analyzer by the Microanalysis Service of the University of Santiago de Compostela. X-ray diffraction data were collected with an Enraf-Nonius CDAD4 automatic diffractometer using the program CAD4-EXPRESS. Most reactions were monitored by TLC on precoated silica gel plates (Merck 60 F254, 0.25 mm). Synthesized products were purified by flash column chromatography on silica gel (Merck 60, 230–240 mesh) and crystallized if necessary. Solvents were dried by distillation prior use. Further details such as figures of different spectra are available online as Supporting Information file SM3.doc.

**Compound 2.** Synthesis and characterization of ( $\pm$ )-3-Amino-3-phenylpropanoic acid. To a solution of benzaldehyde (15.00 g, 141.3 mmol) in EtOH (60 mL) were added ammonium acetate (21.90 g, 283.0 mmol) and malonic acid (14.70 g, 141.3 mmol), and the resulting mixture was heated at 82 °C for 15 h. The precipitated was filtered off and washed with hot EtOH ( $3 \times 20$  mL) to give **2** (14.02 g, yield 61%) as a white solid. Mp 230–232 °C. IR:  $\nu$  2863, 1579, 1509, 1387, 1359  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, TFA- $d$ ):  $\delta$  11.03 (d, 3H,  $J = 4.1$  Hz,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., OH +  $\text{NH}_2$ ), 6.96–6.88 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 4.41–4.38 (m, 1H, CH), 2.95 (ddd, 1H,  $J = 18.4$  Hz, 10.1 Hz, 3.4 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.7 (dd, 1H,  $J = 18.4$  Hz, 3.8 Hz,  $\text{CH}_2$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, TFA- $d$ ):  $\delta$  175.07 (CO), 130.68 (C), 129.02, 127.90, and 124.59 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 51.84 (CH), 34.27 ( $\text{CH}_2$ ) ppm. MS (EI):  $m/z$  (%) 165 (4) [ $\text{M}^+$ ], 164 (2) [ $\text{M} - 1$ ] $^+$ , 119 (3) [ $\text{M}^+ - \text{COOH}$ ], 106 (100), [ $\text{M}^+ - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ ], 104 (17), 79 (34), 77 (22). Anal. Calcd for  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$  (165.19): C 65.44, H 6.71, N 8.48; found: C 65.59, H 6.51, N 8.42.

**Compound 3.** Synthesis and characterization of ( $\pm$ )-3-(2,2,2-Trifluoroacetamido)-3-phenylpropanoic acid. A solution of **2** (4.00 g, 24.2 mmol) in trifluoroacetic anhydride (15 mL), under argon, was stirred at room temperature for 24 h. After evaporation of solvent and trituration in  $\text{Et}_2\text{O}$ , the white solid obtained was washed with  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $3 \times 15$  mL), to give **3** (5.35 g, yield 85%) as a white solid. Mp 124–125 °C. IR:  $\nu$  3315, 1823, 1695, 1551, 1169, 1029  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d$ ):  $\delta$  12.41 (br. s, 1H,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., COOH), 9.92 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., NH), 7.35–7.24 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.24 (dt, 1H,  $J = 8.8$  Hz, 5.6 Hz, CH), 2.95–2.74 (AB part of an ABM system, 2H,  $J_{\text{AB}} = 16.2$  Hz,  $J_{\text{AM}} = 9.4$  Hz,  $J_{\text{BM}} = 5.7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d$ ):  $\delta$  171.65

(COOH), 156.15 ( $\text{COCF}_3$ ), 141.08 (C), 128.78, 127.81, and 126.81 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 118.14 ( $\text{COCF}_3$ ), 50.67 (CH), 40.05 ( $\text{CH}_2$ ) ppm. MS (EI):  $m/z$  (%) 262 (4) [ $\text{M}^+1$ ] $^+$ , 261 (3) [ $\text{M}^+$ ], 244 (12) [ $\text{M}^+ - \text{OH}$ ], 215 (60) [ $\text{M}^+ - \text{COOH}$ ], 202 (100) [ $\text{M}^+ - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ ], 132 (38), 104 (36), 77 (32). Anal. Calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NO}_3$  (261.20): C 50.58, H 3.86, N 5.36. Found: C 50.43, H 3.97, N 5.39.

**Compound 4.** Synthesis and characterization of ( $\pm$ )-3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-3-phenylpropanoyl chloride. A solution of **3** (3.0 g, 11.5 mmol) in thionyl chloride (15 mL) was heated at 82 °C for 24 h. The resulting mixture was evaporated and the residue obtained was triturated in cyclohexane, to give a brown solid, that was filtered off, washed with cyclohexane ( $5 \times 15$  mL), to give **4** (3.15 g, yield 98%) as a yellow solid. Mp 60–62 °C. IR:  $\nu$  3306, 1703, 1556, 1275, 1153  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d$ ):  $\delta$  9.93 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., NH), 7.34–7.23 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.23 (dt, 1H,  $J = 8.8$  Hz, 5.8 Hz, CH), 2.94–2.72 (AB part of an ABM system, 2H,  $J_{\text{AB}} = 16.3$  Hz,  $J_{\text{AM}} = 9.4$  Hz,  $J_{\text{BM}} = 5.6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d$ ):  $\delta$  171.67 (COCl), 156.12 ( $\text{COCF}_3$ ), 141.14 (C), 128.88, 127.89, and 126.84 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 118.18 ( $\text{COCF}_3$ ), 50.69 (CH), 40.07 ( $\text{CH}_2$ ) ppm. MS (EI):  $m/z$  (%) 261(5), 243 (7) [ $\text{M}^+ - \text{Cl}$ ], 215 (100) [ $\text{M}^+ - \text{COCl}$ ], 202 (32) [ $\text{M}^+ - \text{CH}_2 - \text{COCl}$ ], 146 (24), 104 (40), 79 (43). Anal. Calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{ClF}_3\text{NO}_2$  (279.64): C 47.25, H 3.24, N 5.01. Found: C 47.02, H 3.19, N 4.92.

**Compound 5.** Synthesis and characterization of ( $\pm$ )-*N*-(1-oxo-1*H*-3-indanyl)-2,2,2-trifluoroacetamide. A solution of **4** (3.0 g, 10.8 mmol) in  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  (20 mL) was added, at 0 °C, dropwise and under argon, to a solution of  $\text{AlCl}_3$  (2.8 g, 21.4 mmol) in  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  (15 mL) and was heated at 42 °C for 24 h. The excess of solvent was removed to give a brown solid that was triturated in  $\text{H}_2\text{O}$ , filtered off and washed with  $\text{H}_2\text{O}$  ( $3 \times 30$  mL). Then, the solid obtained was dispersed in  $\text{Et}_2\text{O}$  and extracted with a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  ( $5 \times 20$  mL). The combined organic layers were dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Removal of solvent left **5** (1.6 g, yield 62%) as a white solid. Mp 121–123 °C. IR:  $\nu$  3295, 1698, 1551, 1145, 770  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d$ ):  $\delta$  9.98 (d, 1H,  $J = 6.4$  Hz,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., NH), 7.77–7.52 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.57 (t, 1H,  $J = 7.8$  Hz, 3-H), 3.12 (ddd, 1H,  $J = 18.7$  Hz, 8.0 Hz, 2.5 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.61 (dt, 1H,  $J = 18.7$  Hz, 3.3 Hz, 2 $\beta$ -H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d$ ):  $\delta$  203.45 (CO), 159.15 ( $\text{COCF}_3$ ), 153.10 (C-3a), 136.44 (C-7a), 135.49, 129.20, 125.70, and 122.89 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 117.90 ( $\text{COCF}_3$ ), 47.64 ( $\text{CH}_2$ ), 42.67 (CH) ppm. MS (EI):  $m/z$  (%) 243 (43) [ $\text{M}^+$ ], 215 (100), 202 (30), 146 (47) [ $\text{M}^+ - \text{COCF}_3$ ], 104 (53), 77 (55). Anal. Calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_2$  (243.2): C 54.33, H 3.32, N 5.76. Found: C 54.67, H 3.09, N 5.98.

**Compounds 6a and 6b.** Synthesis and characterization of compounds ( $\pm$ )-*cis*- and ( $\pm$ )-*trans*-3-amino-1*H*-indan-1-ol, **6a** and **6b**. To a solution of **5** (1.00 g, 4.11 mmol) in dry MeOH (10 mL) under argon was added  $\text{NaBH}_4$  (0.47 g; 12.33 mmol), and the mixture was extracted with EtOAc ( $15 \times 20$  mL). The combined organic layers were dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). The solvent was removed and the yellow oil residue was purified by flash column chromatography using DCM/MeOH (40:1) as eluent, to give a mixture 60:40 of isomers *cis/trans* **6a/6b** (0.47 g, yield 77%), as a yellow oil. IR  $\nu = 3277$ , 1686, 1459, 1054, 761  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d$ ):  $\delta$  7.36–7.16 (m, 8H,  $\text{H}_{\text{arom(c+t)}}$ ), 5.07 (dd, 1H,  $J = 6.4$  Hz, 3.3 Hz, 1-Ht), 4.82 (t, 1H,  $J = 7.7$  Hz, 1-Hc), 4.36 (t, 1H,  $J = 6.4$  Hz, 3-Ht), 3.91–3.96 (m, 1H, 3-Hc), 3.10 (br. s, 6H,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., OH +  $\text{NH}_2$ (c+t)), 2.67 (dt, 1H,  $J = 13.7$  Hz, 7.0 Hz, 2 $\alpha$ -Hc), 2.19 (ddd, 1H,  $J = 13.2$  Hz, 7.0 Hz, 3.5 Hz, 2 $\alpha$ -Ht), 1.90–1.81 (m, 1H, 2 $\beta$ -Ht), 1.46–1.36 (m, 1H, 2 $\beta$ -Hc) ppm.



$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO-*d*):  $\delta$  147.65 (C-7<sub>ac</sub>), 146.76 (C-7<sub>at</sub>), 145.63 (C-3<sub>ac</sub>), 145.21 (C-3<sub>at</sub>), 127.71, 127.13, 126.92, 126.66, 124.44, 123.80, 123.41, and 123.26 (CH<sub>arom(c+t)</sub>), 72.22 (C-1<sub>c</sub>), 71.12 (C-1<sub>t</sub>), 54.29 (C-3<sub>c</sub>), 52.99 (C-3<sub>t</sub>), 47.55 (C-2<sub>c</sub>), 46.26 (C-2<sub>t</sub>) ppm. MS (EI):  $m/z$  (%) 149 (29) [ $\text{M}^+$ ], 148 (23) [ $\text{M} - 1$ ]<sup>+</sup>, 132 (100) [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ], 117 (18), 104 (98), 77 (19).

**Compounds 7a, 7b, 8a, and 8b.** Synthesis and characterization of compounds ( $\pm$ )-*cis* and ( $\pm$ )-*trans*-3-(*N*-propargylamino)-1-indanol, **7a** and **7b** and ( $\pm$ )-*cis* and ( $\pm$ )-*trans*-3-(*N,N*-dipropargylamino)-1-indanol, **8a** and **8b**. A mixture of **6a/6b** (0.50 g, 3.35 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.46 g, 3.35 mmol), and MeCN (15 mL) was stirred at room temperature under argon for 5 min. A solution of propargyl bromide (0.3 mL, 2.7 mmol) dissolved in MeCN (2 mL) was added dropwise with stirring. After being stirred for 24 h, the solvent was evaporated, and the residue was dissolved in EtOAc (20 mL). The organic layer was washed with NaOH 2 N (3  $\times$  25 mL) and dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). The excess of solvent was removed to give a brown oil, which was purified by flash column chromatography using hexane/EtOAc (4:1) as eluent to give, in first place **8a** (80 mg, yield 18%) as a white solid, then **8b** (60 mg, yield 12%) as a yellow solid, in third place **7a** (150 mg, yield 30%) as a brown solid, and finally **7b** (110 mg, yield 22%) as a brown oil.

( $\pm$ )-*cis*-**7a**. Mp 111–112 °C. IR:  $\nu$  3248, 1441, 1332, 1058, 768  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.49–7.27 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.02 (dd, 1H,  $J = 6.1$  Hz, 3.2 Hz, 1-H), 4.35 (dd, 1H,  $J = 5.9$  Hz, 3.2 Hz, 3-H), 3.48 (d, 2H,  $J = 2.3$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.55 (dt, 1H,  $J = 13.5$  Hz, 6.5 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.40 (br. s, 2H,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., OH + NH), 2.29 (t, 1H,  $J = 2.6$  Hz, CH), 1.88 (dt, 1H,  $J = 13.5$  Hz, 2.9 Hz, 2 $\beta$ -H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  145.72 (C-7a), 143.24 (C-3a), 128.69, 128.44, 125.07, and 124.70 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 81.32 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 74.54 (C-1), 72.40 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 59.04 (C-3), 42.74 ( $\text{CH}_2$ ), 35.92 (C-2) ppm. MS (EI):  $m/z$  (%) 186 (5) [ $\text{M} - 1$ ]<sup>+</sup>, 168 (26) [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ], 148 (100) [ $\text{M}^+ - \text{propargyl}$ ], 130 (71), 116 (72), 77 (80). HRMS (EI): (187)  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}$  calcd 186.0919; found 186.0921.

( $\pm$ )-*trans*-**7b**. IR:  $\nu$  3285, 1455, 1332, 1051, 755  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.44–7.31 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.42 (t, 1H,  $J = 5.9$  Hz, 1-H), 4.63–4.59 (m, 1H, 3-H), 3.49 (d, 2H,  $J = 2.3$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.32–2.26 (m, 1H, 2 $\alpha$ -H), 2.04 (s, 1H, CH), 1.84 (br. s, 2H,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., OH + NH), 1.26 (t, 1H,  $J = 7.3$  Hz, 2 $\beta$ -H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  145.20 (C-7a), 143.52 (C-3a), 128.52, 128.48, 124.67, and 124.60 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 81.83 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 74.53 (C-1), 71.89 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 59.37 (C-3), 43.94 ( $\text{CH}_2$ ), 36.12 (C-2) ppm. MS (EI):  $m/z$  (%) 186 (6) [ $\text{M} - 1$ ]<sup>+</sup>, 168 (23) [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ], 148 (100) [ $\text{M}^+ - \text{propargyl}$ ], 130 (63), 116 (49), 103 (70), 77 (67). HRMS (EI):  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}$  calcd 186.0919; found 186.0920.

( $\pm$ )-*cis*-**8a**. Mp 91–92 °C. IR:  $\nu$  3283, 3198, 1309, 1123, 1054, 767  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.50–7.31 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.02 (t, 1H,  $J = 5.4$  Hz, 1-H), 4.31 (t, 1H,  $J = 6.1$  Hz, 3-H), 3.63–3.50 (AB system, 2H,  $J = 16.9$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.62–3.49 (AB system, 2H,  $J = 16.9$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.81 (br. s, 1H,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., OH), 2.56 (dt, 1H,  $J = 13.7$  Hz, 6.1 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.26 (t, 2H,  $J = 2.5$  Hz, 2  $\times$  CH), 2.13 (dt, 1H,  $J = 13.4$  Hz, 5.0 Hz, 2 $\beta$ -H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  145.35 (C-7a), 142.03 (C-3a), 128.58, 128.30, 125.45, and 124.47 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 79.85 (2  $\times$   $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 74.01 (C-1), 73.22 (2  $\times$   $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 64.41 (C-3), 39.53 (2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 38.31 (C-2) ppm. MS (EI):  $m/z$  (%) 225 (3) [ $\text{M}^+$ ], 224 (4) [ $\text{M} - 1$ ]<sup>+</sup>, 207 (6) [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ], 186 (16) [ $\text{M}^+ - \text{propargyl}$ ], 141 (7), 116 (88), 92 (100), 77 (30). HRMS (EI):  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}$  calcd 225.1154; found 225.1152.

( $\pm$ )-*trans*-**8b**. Mp 64–65 °C. IR:  $\nu$  3271, 2957, 1369, 1137, 1002, 763  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.48–7.30 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5.35 (dd, 1H,  $J = 6.4$  Hz, 3.8 Hz, 1-H), 4.73 (dd, 1H,  $J = 7.0$  Hz, 5.1, 3-H), 3.53–3.40 (AB system, 2H,  $J = 16.9$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.52–3.39 (AB system, 2H,  $J = 16.9$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.60 (ddd, 1H,  $J = 14.0$  Hz, 6.7 Hz, 4.8 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.24 (t, 2H,  $J = 2.5$  Hz, 2  $\times$  CH), 2.10–2.02 (m, 1H, 2 $\beta$ -H), 1.9 (br. s, 1H,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., OH) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  145.17 (C-7a), 142.39 (C-3a), 128.73, 128.62, 125.75, and 124.42 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 80.09 (2  $\times$   $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 74.58 (C-1), 72.94 (2  $\times$   $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 65.49 (C-3), 39.30 (2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 37.62 (C-2) ppm. MS (EI):  $m/z$  (%) 225 (6) [ $\text{M}^+$ ], 224 (4) [ $\text{M} - 1$ ]<sup>+</sup>, 207 (6) [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ], 186 (25) [ $\text{M}^+ - \text{propargyl}$ ], 141 (9), 116 (94), 92 (100), 77 (51). HRMS (EI):  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}$  calcd 225.1154; found 225.1148.

**Compound 9a.** Synthesis and characterization of ( $\pm$ )-*cis*-3-(*N,N*-dipropargylamino)-1-indanyl acetate. A mixture of **8a** (0.08 g, 0.36 mmol), acetic anhydride (69  $\mu\text{L}$ , 0.72 mmol),  $\text{Et}_3\text{N}$  (100  $\mu\text{L}$ , 0.72 mmol), and DMAP (a catalytic amount) in MeCN (5 mL), under argon, was stirred at room temperature for 3 h. The solvent was removed, the residue was partitioned between EtOAc and  $\text{H}_2\text{O}$ , and the organic layer was washed with a saturated solution of NaCl (3  $\times$  15 mL), dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), and evaporated, to give **9a** (0.092 g, yield 96%) as a white solid. Mp 72–73 °C. IR:  $\nu$  3266, 2917, 1728, 1235, 1031, 775  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.48–7.32 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.06 (t, 1H,  $J = 13.5$  Hz, 1-H), 4.58 (t, 1H,  $J = 14.5$  Hz, 3-H), 3.58–3.44 (AB system, 2H,  $J = 16.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.57–3.43 (AB system, 2H,  $J = 16.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.81 (dt, 1H,  $J = 15.2$  Hz, 7.4 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.24 (t, 2H,  $J = 2.5$  Hz, 2  $\times$  CH), 2.19–2.13 (m, 4H, 2 $\beta$ -H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171.01 ( $\text{COCH}_3$ ), 142.84 (C-7a), 140.65 (C-3a), 129.16, 128.50, 125.10, and 124.88 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 80.39 (2  $\times$   $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 75.26 (C-1), 72.81 (2  $\times$   $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 64.91 (C-3), 39.03 (2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 33.12 (C-2), 21.24 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. MS (FAB):  $m/z$  (%) 268 (26) [ $\text{M} + 1$ ]<sup>+</sup>, 225 (2) [ $\text{M}^+ - \text{acetyl}$ ], 208 (5), 171 (5), 154 (91), 137 (100). Anal. Calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_2$  (267.3): C 76.38, H 6.41, N 5.24. Found: C 76.65, H 6.12, N 5.02.

**Compound 10a.** Synthesis and characterization of ( $\pm$ )-*cis*-3-(*N,N*-dipropargylamino)-1-indanyl benzoate. To a solution of **8a** (0.08 g, 0.36 mmol) and DMAP (a catalytic amount) in MeCN (5 mL), at 0 °C and under argon, was added dropwise a solution of benzoyl chloride (82  $\mu\text{L}$ , 0.72 mmol) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (100  $\mu\text{L}$ , 0.72 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The solvent was evaporated, and the residue was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL). The organic layer was washed with a saturated solution of NaCl (3  $\times$  10 mL), dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), and evaporated to give a yellow oil that was purified by flash column chromatography using hexane/EtOAc/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30:1:1) as eluent to give **10a** (0.065 g, yield 65%) as a clear oil. IR:  $\nu$  3291, 1711, 1265, 1108, 1069, 769  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.10–8.07 (m, 2H, 2'-H, 3'-H), 7.60–7.32 (m, 7H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 4  $\times$   $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.33 (t, 1H,  $J = 7.0$  Hz, 1-H), 4.66 (t, 1H,  $J = 7.1$  Hz, 3-H), 3.64–3.50 (AB system, 2H,  $J = 17.0$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.63–3.49 (AB system, 2H,  $J = 17.0$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.93 (dt, 1H,  $J = 14.9$  Hz, 7.6 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.13 (dt, 1H,  $J = 14.1$  Hz, 6.7 Hz, 2 $\beta$ -H), 2.24 (t, 2H,  $J = 2.3$  Hz, 2  $\times$  CH) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.69 (CO), 143.23 (C-7a), 140.97 (C-3a), 133.29 (C'-4), 130.49 (C'-1), 129.96, 129.46, 128.77, 128.62, 125.39, and 125.32 (4  $\times$   $\text{CH}_{\text{arom}}$ , 4  $\times$  C'-H), 80.65 (2  $\times$   $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 76.05 (C-1), 73.08 (2  $\times$   $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 65.28 (C-3), 39.31 (2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 33.52 (C-2) ppm. MS (FAB):  $m/z$  (%) 331 (12) [ $\text{M} + 2$ ]<sup>+</sup>, 330 (37) [ $\text{M} + 1$ ]<sup>+</sup>, 231 (59), 186 (5), 154 (92), 137 (100), 105 (34). Anal. Calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_2$  (329.39): C 80.22, H 5.81, N 4.25. Found: C 80.56, H 5.45, N 4.39.

**Compound 9b.** Synthesis and characterization of ( $\pm$ )-*trans*-3-(*N,N*-dipropargylamino)-1-indanyl acetate. The same procedure as described for **9a** was used to prepare compound **9b** from **8b** by reaction with acetic anhydride, Et<sub>3</sub>N, and DMAP in MeCN. Yield: 67%. Mp 70–71 °C. IR:  $\nu$  3284, 3252, 1720, 1243, 1134 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.47–7.28 (m, 4H, H<sub>arom</sub>), 6.24 (d, 1H, *J* = 4.4 Hz, 1-H), 4.84 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz, 3-H), 3.57–3.41 (AB system, 2H, *J* = 16.9 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.56–3.40 (AB system, 2H, *J* = 16.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.64–2.55 (m, 1H, 2 $\alpha$ -H), 2.25–2.21 (m, 3H, 2 $\beta$ -H, 2  $\times$  CH), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  171.01 (COCH<sub>3</sub>), 143.96 (C-7a), 140.84 (C-3a), 129.42, 128.46, 125.88, and 125.22 (CH<sub>arom</sub>), 80.18 (2  $\times$  C $\equiv$ CH), 76.55 (C-1), 72.91 (2  $\times$  C $\equiv$ CH), 66.06 (C-3), 38.98 (2  $\times$  CH<sub>2</sub>), 33.63 (C-2), 21.25 (CH<sub>3</sub>) ppm. MS (FAB): *m/z* (%) 269 (2) [M<sup>+</sup>2]<sup>+</sup>, 268 (9) [M<sup>+</sup>1]<sup>+</sup>, 230 (70), 186 (5), 154 (100), 137 (97). Anal. Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub> (267.3): C 76.38, H 6.41, N 5.24. Found: C 76.01, H 6.83, N 5.11.

**Compound 10b.** Synthesis and characterization of ( $\pm$ )-*trans*-3-(*N,N*-dipropargylamino)-1-indanyl benzoate. The same procedure as described for **10a** was used to prepare compound **10b** from **8b** by reaction with benzoyl chloride, Et<sub>3</sub>N, and DMAP in MeCN. Yield: 65%. Mp 74–75 °C. IR  $\nu$  = 3281, 3248, 1700, 1267, 1109, 763 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.03–8.00 (m, 2H, 2'-H, 3'-H), 7.57–7.31 (m, 7H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 4  $\times$  H<sub>arom</sub>), 6.51 (dd, 1H, *J* = 7.0 Hz, 3.2 Hz, 1-H), 4.92 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, 3-H), 3.61–3.46 (AB system, 2H, *J* = 16.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.60–3.45 (AB system, 2H, *J* = 16.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.76 (dt, 1H, *J* = 14.4 Hz, *J* = 6.7 Hz, 2 $\alpha$ -H), 2.58 (ddd, 1H, *J* = 14.4 Hz, 7.1 Hz, 2.9 Hz, 2 $\beta$ -H), 2.27 (t, 2H, *J* = 2.3 Hz, 2  $\times$  CH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  166.56 (CO), 143.95 (C-7a), 141.00 (C-3a), 132.95 (C'-4), 130.29 (C'-1), 129.66, 129.46, 128.56, 128.29, 126.02, and 125.35 (4  $\times$  CH<sub>arom</sub>, 4  $\times$  C'-H), 80.17 (2  $\times$  C $\equiv$ CH), 77.27 (C-1), 72.98 (2  $\times$  C $\equiv$ CH), 66.13 (C-3), 39.07 (2  $\times$  CH<sub>2</sub>), 33.85 (C-2) ppm. MS (FAB): *m/z* (%) 331 (12) [M + 2]<sup>+</sup>, 330 (48) [M + 1]<sup>+</sup>, 230 (62), 186 (5), 154 (99), 137 (100), 105 (23). Anal. Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> (329.39): C 80.22, H 5.81, N 4.25. Found: C 80.45, H 5.32, N 4.60.

**MAO Inhibition Assay of Rasagiline Analogues.** The potential effects of the test drugs on hMAO activity were investigated by measuring their effects on the production of hydrogen peroxide from *p*-tyramine (a common substrate for both hMAO-A and hMAO-B), using the 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine as reagent and microsomal MAO isoforms prepared from insect cells (BTI-TN-SB1-4) infected with recombinant baculovirus containing cDNA inserts for hMAO-A or hMAO-B.<sup>73,74</sup> The production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalyzed by MAO isoforms can be detected using the previously mentioned reagent, a nonfluorescent, highly sensitive, and stable probe that reacts with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of horseradish peroxidase to produce a fluorescent product, resorufin. In this study, hMAO activity was evaluated using the above-mentioned method, following the general procedure described previously by us.<sup>86</sup> The tested drugs (new compounds and reference inhibitors) inhibited the control enzymatic MAO activities and the inhibition was concentration-dependent. The corresponding IC<sub>50</sub> values and MAO-B selectivity ratios [IC<sub>50</sub> (MAO-A)]/[IC<sub>50</sub> (MAOB)] are shown in the prediction of rasagiline analogues section. The assayed compounds themselves do not react directly with the 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine, which indicates that these drugs do not interfere with the measurements. In our experiments and under our experimental conditions, hMAO-A displayed a Michaelis constant (*K*<sub>m</sub>) of 457.17 (38.62  $\mu$ M and a maximum reaction velocity (*V*<sub>max</sub>) of

185.67 (12.06 nanomol/min/mg protein, whereas hMAO-B showed a *K*<sub>m</sub> of 220.33 (32.80  $\mu$ M and a *V*<sub>max</sub> of 24.32 (1.97 nanomol/min/mg protein (*n* = 5).

### Study of *Trichomonas* Proteins Isolated from Pigeon (Experiment 2)

**Sampling and Parasite Culture.** Trophozoites were obtained from the oral cavity of a naturally infected pigeon. The pigeon from an urban loft was captured in the Valencian Community (a region on the eastern coast of the Iberian peninsula) and was released after sampling. The strain was identified as a genotype A using polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism and sequencing the 5.8S rRNA gene and the surrounding ITS1 and ITS2 regions.<sup>87</sup> Trophozoites were grown in triptone/yeast extract/maltose (TYM) medium supplemented with 10% fetal calf serum and incubated at 37 °C.

**Sample Preparation.** Trophozoites were recovered on day 2 postinoculum (p.i.), and the parasites were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4 °C. The resulting pellet was washed five times with 0.5 mM Tris-HCl pH 7.8 and resuspended in this same buffer. The sample was sonicated for 10 s with a Virsonic 5 (Virtis, NY, USA) set at 70% output power on ice bath. The homogenate was extracted in 5 mM Tris-HCl buffer pH 7.8 containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) as a protease inhibitor, at 4 °C overnight, and subsequently centrifuged at 10,000g for 1 h at 4 °C (Biofuge 17RS: Heraeus Sepatech, Gmb, Osterode, Denmark). The supernatant was dialyzed overnight at 4 °C in 0.5 mM Tris-HCl buffer. To eliminate contaminating substances such as salts, nucleic acids, etc., protein content was precipitated by 20% TCA (trichloroacetic acid) in acetone with 20 mM DTT for 1 h at -20 °C, added 1:1 to the homogenated sample. Next, the sample was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min and the pellet was washed with cold acetone containing 20 mM DTT. Residual acetone was removed by air drying. In order to achieve a well focused first-dimension separation, sample proteins must be completely disaggregated and fully solubilized, in a sample buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% Chaps, Destreak buffer (Amersham Biosciences), 5 mM CO<sub>3</sub>K<sub>2</sub>, 2% IPG buffer (Amersham Biosciences) and incubated at room temperature for 30 min.

Following clarification by centrifugation at room temperature (12,000 rpm, 10 min) the supernatants were stored frozen.

**2-DE.** A volume of 340  $\mu$ L of rehydration buffer was added to promastigotes solubilized extracts (7 M urea, 2 M thiourea, 2% Chaps, 0.75% IPG buffer 4–7, bromophenol blue) and immediately was adsorbed onto 18 cm immobilized pH 3–10 gradient (IPG) strips (Amersham Biosciences). Optimal IEF was carried out at 20 °C, with an active rehydration step of 12 h (50 V), and then focused on an IPGphor IEF unit (Amersham Biosciences) by using the following program: 150 V for 2 h, 500 V for 1 h, 1000 V for 1 h, 1000–2000 V for 1 h, and 8000 V for 12 h. After focusing, IPG strips were equilibrated for 15 min in 10 mL of 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, traces of bromophenol blue containing 100 mg of DTT. And further they were incubated for 25 min in the same buffer replacing DTT by 300 mg of iodoacetamide. After equilibration, the IPG strips were placed onto 12, 5% SDS-polyacrilamide gels and sealed with 0.5% (w/v) agarose. SDS-PAGE was run at 15 mA/gel for 20 min as initial migration and increased to 30 mA/gel for separation until front dye reached the bottom of the gel. 2D gels were stained with colloidal Coomassie stain.

**MS/MS Protein identification.** Proteins of interest were excised from analytical gels using the automated spot picker



Propic (Genomic Solutions), digested with sequencing grade trypsin (Promega) as described elsewhere,<sup>88</sup> and subjected to PMF with MS/MS analysis of several precursors. The digestion mixture was dried in a vacuum centrifuge and resuspended in 7  $\mu$ L of 0.1% TFA (trifluoroacetic acid, Sigma), and 1  $\mu$ L was spotted onto the MALDI target plate. After the droplets were air-dried at room temperature, 0.5  $\mu$ L of matrix (5 mg/mL CHCA  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma) in 0.1% TFA-ACN/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) was added and allowed to air-dry at room temperature. The resulting samples were analyzed in a 4700 proteomics analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) in positive reflectron mode (2000 shots every position). Five of the most intense precursors (according to the threshold criteria: minimum signal-to-noise, 10; minimum cluster area, 500; maximum precursor gap, 200 ppm; maximum fraction gap, 4) were selected for every position with the aim of the MS/MS analysis. The five most intense precursors were selected for MS/MS. MS/MS data were acquired using the default 1 kV MS/MS method. The samples without a positive identification were desalted and concentrated by  $\mu$ C18 ZIP-TIP (Millipore), eluted with 1  $\mu$ L of matrix directly on the MALDI target, and analyzed in the same way.

**Database Search.** We performed a search on Swiss-Prot, NCBI, and EST\_Trichomonada (NCBI) databases using the MASCOT search engine (Matrix - Science).<sup>89–93</sup> The MS and MS/MS information was sent to MASCOT via the GPS software (Applied Biosystems). Searches were done with tryptic specificity allowing one missed cleavage and a tolerance on the mass measurement of 100 ppm in MS mode and 0.1 Da for MS/MS ions. Carbamidomethylation of Cys was used as a fixed modification and oxidation of Met and deamidation of Asn and Gln as variable modifications.

## RESULTS

### Models

**LDA Model.** This is the first mt-QSAR model used for the probability of binding organic compounds to a very large diversity of receptors based only on the molecular connectivity of the drug and protein receptor. An application of the present model is the prediction of the protein receptor or active place with a specific drug and vice versa, the prediction of drugs with their proteins. In both cases, receptor susceptibility identification is imperative. Detailed information on the compounds, predicted classification, and probability of affinity on different receptors of the drugs used to seek the model are shown in Table 1SM of the Supporting Information. Using this model, we can predict the different relationships between the drug–protein connectivity and the physicochemical property. Common physicochemical properties have been demonstrated to be useful on protein QSAR.<sup>94,95</sup> This work introduces for the first time a single linear mt-QSAR equation model to classify drugs with their respective protein receptor. The best model found was

$$\begin{aligned} S(\text{DTP})_{\text{pred}} = & -0.60521 \cdot \chi_5(\text{C}_{\text{sp}3}) + 1.45456 \cdot \chi_0(\text{X}) \\ & + 1.17331 \cdot \chi_5(\text{H-Het}) - 0.01562 \cdot \xi_5(\text{inner}) \\ & - 1.01668 \cdot \xi_0(\text{middle}) + 1.23241N = 6098 \\ \chi^2 = & 2350.53 \quad p < 0.001 \end{aligned} \quad (5)$$

where  $N$  is the number of cases (DTPs) used to train the model and Chi-square ( $\chi^2$ ) used to test significant discrimination between DTPs and non-DTPs of compounds with low affinity by the target protein (nDTPs), with  $p < 0.001$  level of error. There are three structural parameters for drugs, all being average values of electronegativities ( $\chi_i$ ) for the main type of atom and their  $j$ th neighbor atoms placed at a

**Table 1. Results of LDA Classification Models**

parameter	%	cases <sup>a</sup>	nDTPs	DTPs
Train				
specificity	94.9	nDTPs	3304	176
sensitivity	91.6	DTPs	51	555
accuracy	94.4	total		
Validation				
specificity	95.4	nDTPs	1627	79
sensitivity	92.2	DTPs	24	282
accuracy	94.9	total		

<sup>a</sup> DTPs: drug–target pairs for compounds with high affinity. nDTPs: drug–target pair for compounds with no affinity.

given topological distance  $d_{ij}$  with respect to the  $i$ th atoms. There are also two structural parameters for targets, all being average values of 3D-electrostatic potentials ( $\xi_j$ ) for the region in the protein of the amino acid selected and their  $j$ th neighbors placed at a given topological distance  $d_{ij} = k \cdot r_{\text{cutoff}}$  ( $k$  times the cutoff value  $r_{\text{cutoff}}$ ) of 7 Å with respect to the  $i$ th amino acid of reference. The physical meanings for the parameters used in this equation are listed as follows:

$\chi_5(\text{C}_{\text{sp}3})$  = average electronegativity of  $\text{C}_{\text{sp}3}$  atoms and their neighbors with  $d_{ij} \leq 5$

$\chi_0(\text{X})$  = average electronegativity of halogen atoms (X),  $d_{ij} = 0$

$\chi_5(\text{H-Het})$  = average electronegativity of heteroatom-bound hydrogens (H-Het) and neighbors at  $d_{ij} \leq 5$

$\xi_5(\text{inner})$  = average electrostatic potential for inner amino acids and their neighbors at  $d_{ij} \leq 35$  Å ( $k = 5$ )

$\xi_0(\text{middle})$  = average electrostatic potential for all amino acids in the middle region  $d_{ij} = 0$  ( $k = 0$ )

This model using only 5 variables presented an overall training accuracy of 94.4%. The model classified correctly 555 out of 606 DTPs (sensitivity of 91.6%) as well as 3,304 out of 3,480 nDTPs (specificity of 94.9%) in training series. The validation of the model was carried out by means of external predicting series; these cases were never used to train the model. The model classified correctly 282 out of 306 DTPs (sensitivity = 92.2%) and 1627 out of 1706 nDTPs (87.22%) in validation series. Accuracy for validation series was the same as for training series 94.9%. These results (Table 1) indicate that we developed an accurate model according to previous reports on the use of LDA in QSAR.<sup>96,97</sup>

**Comparison with Previous ML Models.** The LDA model shows excellent results with respect to other linear machine-learning (ML) models published previously. The model uses a relatively small number of structural parameters. The model presented 5 structural parameters altogether (3 for drugs + 2 for proteins). These parameters were selected from a relatively short pool of 65 parameters (35 for drugs and 30 for proteins). To assess the importance of this result, we compared our linear ML models with other models used to address the same problem.

**Linear Models.** The two other linear models found used more structural parameters to solve the same problem and they are based on a notably lower number of DTP/nDTP cases. One of these models used the LDA technique and needed 10 variables to fit a data set of only 2,559 cases with a notably lower accuracy, of only 72.3%.<sup>65</sup> The other linear model found used linear regression and needed a notably higher number of parameters (28 variables) to fit a very small database of only 129 cases.<sup>98</sup> More probably, because of the promising but nonoptimal results

Table 2. Comparison of our LDA model with other ML models

drugs		targets			model							
I <sup>a</sup>	D <sup>b</sup>	type <sup>c</sup>	I <sup>a</sup>	D <sup>b</sup>	method <sup>d</sup>	N <sup>e</sup>	N <sub>v</sub> <sup>f</sup>	tech <sup>g</sup>	acc <sup>h</sup>	P <sup>i</sup>	WS <sup>j</sup>	ref <sup>k</sup>
Linear Models												
χ	2	prot	ξ	3	MI	6098	5	LDA	94.4	%	yes	1
PP	2	MR	PP	1	MI	2559	10	LDA	72.3	%	no	65
PP	2	prot	PP	3		129	28	SMLR	73	R	no	98
Nonlinear Models												
CTD	2	prot	σ		DTL	5367	2	SVM	94.4	%	no	99
PLB	2	prot	PLC		ReliefF	1300		LSVM	89.9	R	no	160
S	2	MR		2	BLM			KRM	95.5	ROC	no	100
ΔG	2	prot	ΔG		PROPKA	26					no	101
PP	2	prot	PP	3		372		RSVM	84.0	%	no	102
ΔG	2	prot	ΔG		GBSA	2331	2				no	103
MOE	2	prot	MOE	3	CoIFA	133	17	GFA	81.2	%	no	104
SD	2	prot	SD	3	NTD	2274		ROC	99.3	ROC	no	105
ΔG	3	prot	ΔG	3	LBDD			QM	99.6	R	no	106
χ	2	prot	χ	3	nnsort	517		kNN	85	R	no	107
ΔG	3	enz	ΔG	3	PBSA	48		PI	97	R	no	108
χ	3	prot	χ	3	CoMSIA	26		PCA	86	R	no	109

<sup>a</sup> Structural indices: drugs total or group electronegativity (χ), protein total or region electrostatic potential (ξ), similarity (S), Gibbs free energy (ΔG), physicochemical properties (PP), composition (C), transition (T), distribution (D), kernel parameter (σ), protein sequence, ligand-structure and binding-pocket (PLB), molecular operating environment (MOE), surflex-dock parameters (SD). <sup>b</sup> Dimension of the structure parameters: 1D, 2D, and 3D structure. <sup>c</sup> Types of drug targets: all types of proteins (prot), membrane receptor protein (MR), enzymes (enz). <sup>d</sup> Method: MARCH-INSIDE (MI), bipartite local model (BLM), drug–target likeness (DTL), pK<sub>a</sub> values for protein ligand complexes (PROPKA), comparative interaction fingerprint analysis (CoIFA), negative training data (NTD), ligand-based drug design (LBDD), quantum mechanics (QM), molecular mechanics + generalized born surface area theory (GBSA). <sup>e</sup> Number of cases used to seek the model. <sup>f</sup> Number of variables in the model. <sup>g</sup> Statistical method used to seek the model: linear discriminant analysis (LDA), support vector machine (SVM), kernel regression-based method (KRM), multi layer perceptron (MLP), stepwise multiple linear regression (SMLR), genetic function approximation (GFA), *k*-nearest neighbors (kNN), predictive index (PI), partial-least-square (PLS), least-square + support-vector machine (LSVM), radial-basis function + support-vector machine (RSVM), principal component analysis (PCA). <sup>h</sup> Accuracy. <sup>i</sup> Paramater used in the accuracy. <sup>j</sup> Model implemented as a public online Web Server (WS). <sup>k</sup> Reference. <sup>l</sup> This work.

obtained with linear models, other researchers decided to explore more complicated nonlinear techniques to fit DTP data sets.

**Nonlinear Models.** An excellent nonlinear model has been reported to use only two variables to seek a data set with a lower but still comparable number of cases (5,367), 731 DTPs less than those contained by our database. With respect to the number of parameters, the model is simpler but also similar to our model 2 versus Five structural parameters. However, with respect to the number of adjustable parameters, our model is a linear equation found with the LDA algorithm, whereas the other model is a notably more complicated nonlinear ML model, which uses the nonlinear support vector machine (SVM) algorithm.<sup>99</sup> All the other models found included less than 20 or unknown number of parameters, but only some of them have 1000+ cases. No other model found has 5000+ cases. All of these models used more complicated nonlinear algorithms such as SVM, principal component analysis (PCA), and others.<sup>65,100–103</sup> However, some of these other models have low accuracy or the use of the ROC curves or correlation coefficients make a comparison more difficult.<sup>98,104</sup> Other studies do not show the number of variables (NV) involved in the model; see Table 2 for details.<sup>105–109</sup> In addition, one of the most important features of our result is that many of these models are not available for a free use online. Conversely, our model has been implemented into a public web server that may be used providing only the SMILE codes of drugs and the PDB id's or own structure files of target proteins (see next sections).

### MIND-BEST Web Server

The Internet era training and validation of a QSAR and/or computational model should be considered the first step toward the development of a valuable tool of bioinformatics application in proteome research. At the present time, seeking a fast and accurate predictive model is not enough; it should also be implemented on public servers, preferably of open access, available online to the scientific community. The server packages developed by Chou and Shen to predict the function of proteins from structural parameters or explore protein structures<sup>110–113</sup> are good examples in this sense. These may be used by proteome research scientists by interacting with user-friendly interfaces. It means that the user does not need to be an expert on the theoretical details behind this kind of models, including the vast literature published by Chou et al. on the development of models with pseudoamino acid composition parameters or the use of ML classification techniques and other algorithms.<sup>114–118</sup> However, there are not many reports on DTP prediction QSAR-based servers depending on fully curated databases like FDA approved drugs and targets as well as with automatic upload of new proteins by means of online connection to PDB. In this sense, we implemented the best LDA model found here at web portal Bio-AIMS as an online server called MIND-BEST. The acronym MIND-BEST comes from MARCH-INSIDE Nested Drug-Bank Exploration & Screening Tool. MIND-BEST is located at <http://miaja.tic.udc.es/Bio-AIMS/MIND-BEST.php>. This online tool is based on PHP/HTML and Python routines



approved drugs and proteins. For DTPs and nDTPs previously included into the FDA data, the server MIND-BEST does not evaluate the pair (run the LDA model) but gives directly the unknown answer. Otherwise, MIND-BEST evaluates the query drugs versus all query proteins. Taking into account that the name of a drug may present many other synonym names and the SMILE code is not unique for a drug, MIND-BEST uses a drug–drug similarity (DDS) score to decide whether a drug is already present on FDA data or it is a very close analogue. There are different similarity values for drugs and proteins in the literature.<sup>119–125</sup> Some important databases such as ChEMBL, with more than 2,000,000 activity outcomes (<http://www.ebi.ac.uk/chembl/db/>), implement search algorithms based on similarity scores. This shows the importance of incorporating this feature into new servers. One of the salient features of MIND-BEST is the use of only one theoretical background for structure characterization in terms of drug structure, protein structure, drug–drug similarity, protein–protein similarity, and DTP–DTP similarity. In this sense, MIND-BEST uses the MARCH-INSIDE parameters for all of these purposes. Therefore, we introduce here for the first time a DDS score for MIND-BEST using the  $k\chi(G)$  values of the  $r$ th query drugs  $k\chi(G)_{\text{query}r}$  and sth FDA approved drugs  $k\chi(G)_{\text{fdas}}$ . The server



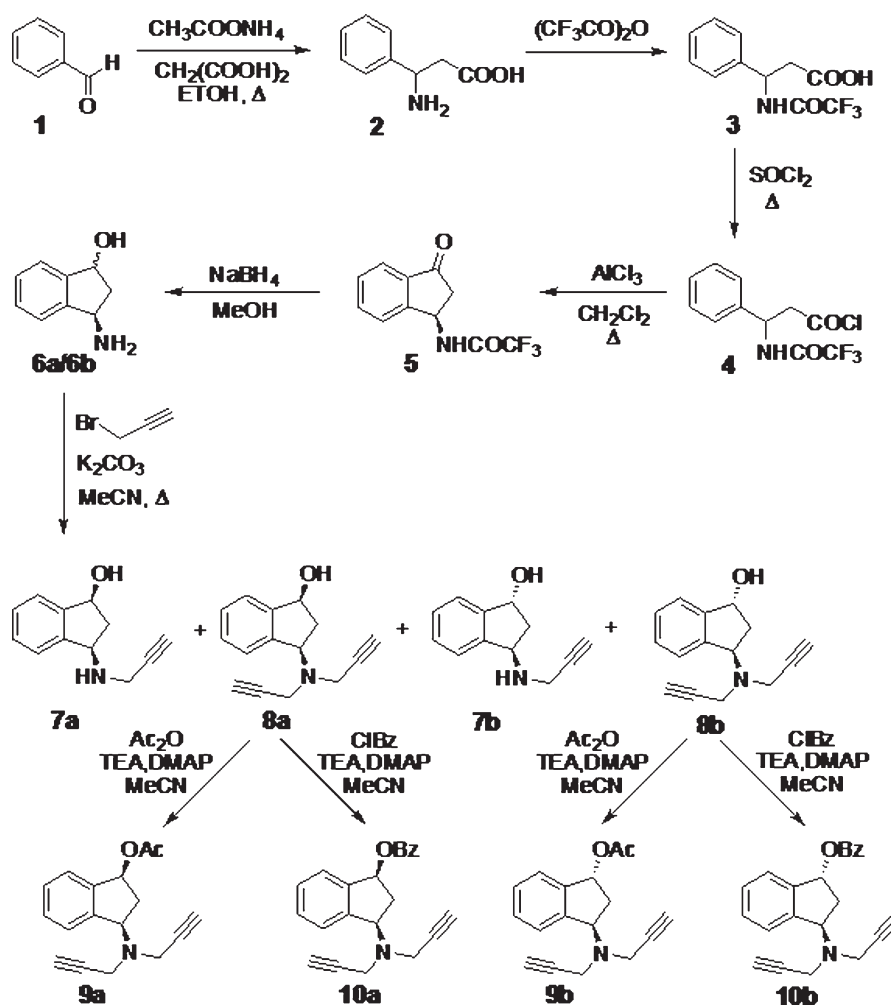


Figure 4. Synthesis of rasagiline derivatives.

MIND-BEST uses a similar procedure to calculate protein–protein similarity  $PPS_{F-Q}$  scores for  $u$ th query and  $v$ th FDA approved drug protein targets. By analogy to the drug–drug case, MIND-BEST decides when a protein is already in the FDA list using first the PDB id and for negative case adding a search with  $PPS_{F-Q}$  scores. Finally, based on the same idea, MIND-BEST determines similarity between  $r$ th +  $u$ th DTPs in query list versus  $s$ th and  $v$ th DTPs in the FDA list using a DTP–DTP similarity score DPS. For pairs already present in the FDA list  $DPS(\%) = 100\%$ , the server MIND-BEST omits the evaluation with LDA and provides the experimental answer. Otherwise, the server carries out evaluation and gives the predicted answer but also gives the result for the DTP made up of the most similar drug and the most similar protein in the FDA list. As follows we provide the mathematical formula for these scores, where the subscripts F = FDA and Q = query.

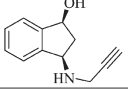
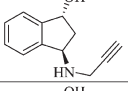
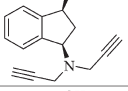
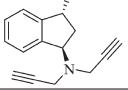
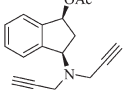
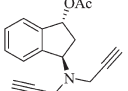
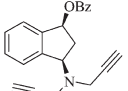
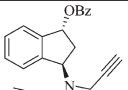
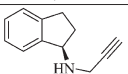
$$DDS_{F-Q}(\%) = 100 \cdot \left[ 1 - \frac{(\sum_{G,k} |^k\chi(G)_F - ^k\chi(G)_Q|)}{(\sum_{G,k} ^k\chi(G)_Q)} \right] \quad (6)$$

$$PPS_{F-Q}(\%) = 100 \cdot \left[ 1 - \frac{(\sum_{R,k} |^k\xi(R)_F - ^k\xi(R)_Q|)}{(\sum_{R,k} ^k\xi(R)_Q)} \right] \quad (7)$$

$$DPS(\%) = 100 \cdot \left[ 1 - \frac{(\sum_{G,k} |^k\chi(G)_F - ^k\chi(G)_Q|)}{(\sum_{G,k} ^k\chi(G)_Q)} \right] \cdot \left[ 1 - \frac{(\sum_{R,k} |^k\xi(R)_F - ^k\xi(R)_Q|)}{(\sum_{R,k} ^k\xi(R)_Q)} \right] \quad (8)$$

**MIND-BEST mode 2.** The present server was trained and validated to use the SMILE codes of new organic compounds to predict target proteins for these compounds from the list of previously approved FDA proteins (mode 1). In mode 1, MIND-BEST may be also used to select potential targets for new compounds between proteins currently unknown as drug targets but with known 3D structures that have been released to PDB. However, there are other potential uses of this server. How should one predict DTPs for 3D structures of proteins which were not represented on the FDA list given before and not released to PDB? Certainly, the server was created to calculate  $S_{pred}$  values only for these proteins, therefore for other proteins, the answer is simply in general: you should use another server based on a classifier trained and validated with a database that

**Table 3.** Prediction of Rasagiline Analogues with the New Server

Drug <sup>a</sup>	MAO-A <sup>b</sup>				structure	MAO-B <sup>b</sup>			
	IC <sub>50</sub>	OC	PC	p(A)		IC <sub>50</sub>	OC	PC	p(B)
7a	>100	0	0	0.9		>100	0	1	0.6
7b	>100	0	0	0.9		>100	0	0	0.1
8a	>100	0	0	0.9		11.38 ± 0.77	1	1	0.8
8b	>100	0	0	0.9		1.49 ± 0.04	1	1	0.6
9a	>100	0	0	0.9		>100	0	0	0.9
9b	>100	0	0	0.9		>100	0	0	0.9
10a	>100	0	0	0.9		>100	0	0	0.9
10b	>100	0	0	0.9		>100	0	0	0.9
Rs	0.412 ± 0.04	0	0	0.9		0.0443 ± 0.009	1	1	0.7

<sup>a</sup> Rs = rasagiline; which was used as positive control. <sup>b</sup> >100 = compound inactive at 100  $\mu$ M (the highest concentration tested), OC = observed class, and PC = predicted class. OC = 1 if compound IC<sub>50</sub> < 25  $\mu$ M,<sup>73,74</sup> and PC = 1 if the DTP probability predicted for pair drug-MAO-i enzyme  $p(\text{MAO-i}) > 0.5$  (PDB id's 2Z5X and 2VZ2, respectively, for MAO-A and B used by MIND-BEST to predict  $p$ -values)

contained other proteins. However, we should not forget that the model was trained using protein parameters for many different protein structures. Consequently, it is technically possible to estimate DPPs for other proteins if we introduce as inputs for the classifier protein or peptide 3D structural models that we created using LOMETS server. The reader should remember at this point that the classifier was trained with proteins of many different DTPs. For these situations, we incorporated the input mode 2 to the server. This input mode is essentially the same as mode 1, but the server prompts the users to upload ENT and PDB files with 3D structures of proteins of peptides generated by them using MM/MD algorithms. In Figure 3B we depict the user interface for MIND-BEST including **mode 2** (bottom of the web page). We have to be aware that by using this input mode 2 we predict  $S_{\text{pred}}$  scores for DTPs using structural models generated only by modeling. Consequently, predictions derived with input mode 2 have to be used with higher caution than predictions obtained with input mode 1.

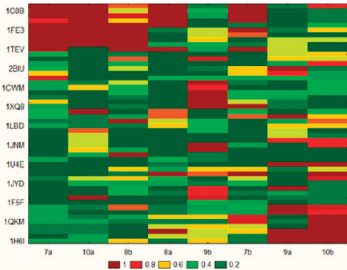
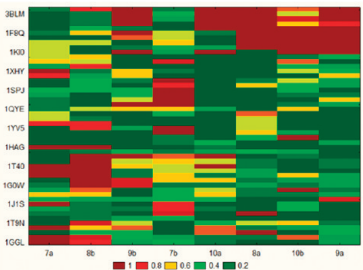
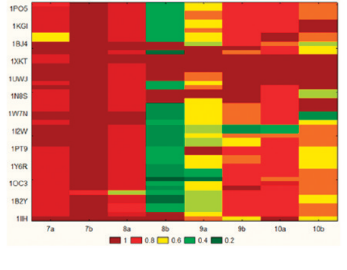
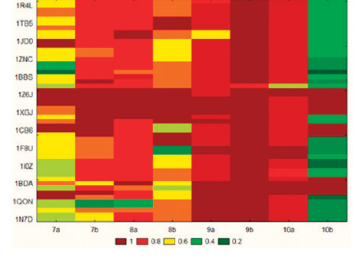
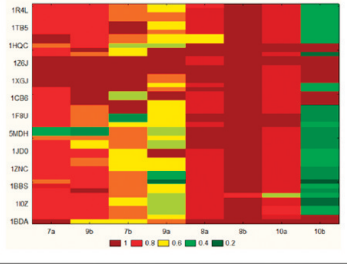
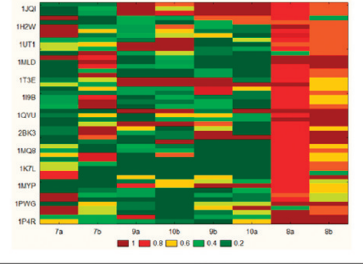
## MIND-BEST Illustrative Experiments

### Study of Rasagiline Analogues (mode 1)

**Synthesis, Characterization, and Assay.** In order to show how we can use the MIND-BEST server in real life, we have introduced here for the first time the synthesis, characterization, biological assay, and predictive study of 8 derivatives of rasagiline. Rasagiline is an interesting inhibitor of MAO-B, promising for Parkinson's disease treatment.<sup>126,127</sup> We perform the synthesis and characterization of compounds (7a,b, 8a,b, 9a,b, and 10a,b) according to the strategy given in Figure 4. As shown in this scheme, *N*-(1-oxo-1*H*-3-indanyl)trifluoroacetamide **5** was prepared by intramolecular cyclization of 3-amino-3-phenylpropanoic acid, **2**, following procedures previously described in the literature.<sup>128</sup> Compound **2** was prepared by reaction of Rodionow-Johnson of an ethanolic solution of benzaldehyde, malonic acid, and ammonium acetate, in 61% yield. After protection of the amino group with trifluoroacetic anhydride at room temperature and treatment with thionyl chloride, compound **4** was involved in an intramolecular cyclization reaction using excess aluminum chloride in refluxing dichloromethane. After treatment with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>, the ketoamide **5** was obtained. The partial reduction of the ketone group and deprotection of amino group of compound **5** were performed simultaneously with NaBH<sub>4</sub> in methanol, affording a mixture of epimers aminoalcohols **6a–6b** in 70% yield.<sup>129,130</sup> <sup>1</sup>H NMR analysis of mixture obtained indicates that the epimers are present in a *cis:trans* ratio of 60:40. The alkylation of the mixture **6a,6b** with propargyl bromide and potassium carbonate in hot acetonitrile provided in a global yield of 82%, a mixture of the corresponding mono- and dipropargylated derivatives (7a,7b and 8a,8b), which were easily separated by flash column chromatography using hexane/EtOAc (4:1) as eluent.<sup>131</sup> Compounds **8a** and **8b** were converted to the corresponding acetates **10a** and **10b**, in good yields, by treatment with acetic anhydride, Et<sub>3</sub>N, and catalytic amounts of DMAP in MeCN.<sup>132</sup> In the same way and using benzoyl chloride instead of acetic anhydride, the corresponding benzoates **11a** and **11b** were prepared. We reported the detailed characterization results for all of these compounds in the Materials and Methods section, including infrared spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance (NMR), and mass spectroscopy (MS); see Supporting Information file SM3.doc.

**MIND-BEST Prediction of Rasagiline Analogues (mode 1).** We also generated the SMILE codes for these compounds and predicted their propensity to make up DTPs with MAO-A and MAO-B using MIND-BEST. Despite a positive or negative prediction we report all values to illustrate the results. In Table 3, we report the results obtained using this server and the outcomes of the pharmacological assay. The compound rasagiline, a known MAO inhibitor, selective for MAO-B was used as control. As MIND-BEST is a classifier, we used the variable OC = observed class and PC = predicted class, previously reported for this type of study. On the basis of the literature for QSAR studies of MAO inhibitors, we consider OC = 1 if compound IC<sub>50</sub> < 25  $\mu$ M<sup>73,74</sup> and PC = 1 if the DTP probability predicted for pair drug-MAO-i enzyme  $p(\text{MAO-i}) > 0.5$ . In the *in silico* experiment 2Z5X and 2VZ2, the PDB id of MAO-A and -B were used as input by MIND-BEST to predict  $p$ -values. The result is satisfactory and allows us to verify that derivatives **8a** and **8b** are selective inhibitors of MAO-B as shown by the pharmacology presented in this paper. In addition, our model predicts the lack of interaction with the MAO-A (see Table 3).

Table 4. TWJ Analysis of Server Outcomes for Rasagiline Derivatives versus FDA-Approved Targets<sup>a</sup>

TWJ map	Val.	P	Val.	TWJ map
	8	V	8	
	50	C	50	
	<0.05	Tc	<0.05	
	155	B	155	
	0.99	M	0.99	
	<0.05	Sd	<0.05	
	8	V	8	
	50	C	50	
	<0.05	Tc	<0.05	
	73	B	79	
	0.99	M	0.99	
	<0.05	Sd	<0.05	
	8	V	8	
	60	C	63	
	<0.05	Tc	<0.05	
	72	B	148	
	0.99	M	0.99	
	<0.05	Sd	<0.05	

<sup>a</sup> V = number of variables; C = number of cases; Tc = threshold computed from data; B = number of blocks; M = total sample mean (M); Sd = standard deviation.

An additional use of MIND-BEST server was to predict the selectivity of the new rasagiline derivatives MAO-B inhibitors with respect to all other targets previously approved by FDA. This type of experiment is of major importance due to the cost in terms of animal sacrifice, time, materials, and human resources of the experimental assay of all compounds against all these targets. Therefore, we used MIND-BEST to calculate DTPs scores for our compounds and developed a two-way joining (TWJ) cluster analysis in order to better illustrate drug versus target result table. In Table 4 we depict six figures, one figure for every 50 proteins tested against the 8 derivatives. We found that overall, the 8 derivatives were predicted to be negative against all proteins in the FDA database with more than 90% of probability. To see if our results are stable, in the table is displayed that the threshold value Tc is 0.9 and the standard deviation is less than 0.02. These values indicate the low level of error and the high level of selectivity of the 2 active derivatives of rasagiline (see Table 4).

**MIND-BEST Study of Peptides Found on G3PDH of Parasite *T. gallinae* (mode 2).** Avian trichomonosis is a parasitic disease caused by the protozoan *Trichomonas gallinae*. Parasites live mainly in the bird's anterior digestive tract, where

they can cause granulomatous lesions that occlude the esophagic lumen, leading to its death as a result of severe starvation.<sup>133</sup> Columbidae are known as the parasite's main host, particularly the domestic pigeon (*Columba livia*), which has been considered responsible for the worldwide spread of *T. gallinae*.<sup>134</sup> Currently *T. gallinae* is considered an emerging pathogen in threatened birds, especially in certain species of birds of prey, such as the Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*), which have been forced to increase consumption of pigeons as a result of lost of their natural habitat.<sup>135</sup> In this experiment we have carried out a theoretical-experimental study of peptides present in a protein found in a genotype of *T. gallinae* isolated from pigeon. Using 2DE, MS, and MASCOT search we demonstrated that this protein was a plausible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) enzyme. G3PDH is an important enzyme that catalyzes the conversion of glyceraldehyde 3-phosphate, as the name indicates. This is the sixth step of the breakdown of glucose (glycolysis), an important pathway of energy and carbon molecule supply located in the cytosol of eukaryotic cells. In addition to this long established metabolic function, GAPDH has recently been involved in several nonmetabolic processes, including transcription

activation, initiation of apoptosis.<sup>136,137</sup> An inhibitor of G3PDH is deprenyl, which has been used clinically to treat Parkinson's, strongly reduces the apoptotic action of GAPDH by preventing its S-nitrosylation, and thus it might be used as a drug.<sup>138</sup> Consequently, using the web server LOMETS Online (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/LOMETS/>) we created models for the 3D structure of the peptides of this protein.<sup>72</sup> Lastly, using MIND-BEST we also predicted the interaction of these peptides with all FDA drugs. It could be useful in the search of new G3PDH inhibitors for the treatment of avian trichomoniasis.

**2DE and MS Study of Peptides Found on New Protein PMF.** In this section we present an example of the practical use of the QSAR model to predict enzyme scores for peptides found in the PMF of a new query protein. We illustrate an overall view of the 2DE map obtained from *T. gallinae* (see Figure 5). In this

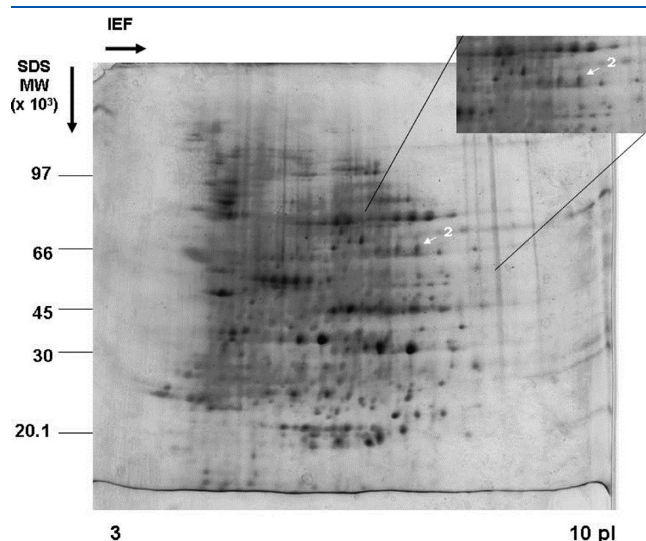


Figure 5. 2-DE map obtained for *T. gallinae* proteome.

figure, we zoomed in to highlight a spot that corresponds to a protein of MW > 60,000 Da and pI > 7, which has not been investigated before. Our interest in this area derived from the fact that these spots remained unchanged from gel to gel repetitions and may correspond to a relevant but unknown protein of this parasite.

The protein sample corresponding to this spot was submitted to an in-gel trypsin digestion, and the mass of the resulting peptides was measured by MALDI-TOF MS analysis. Once we obtained the data from MALDI-TOF MS analysis of the query spot, the most relevant MS signals were introduced into the MASCOT search engine.<sup>139,140</sup> As the MASCOT collection of annotated databases does not contain data about the *T. gallinae*, we used the database of annotated *T. vaginalis* proteins with MS, recorded because of its similarity to *T. gallinae*; in fact, two common ground-dove (*Columbina passerina*) isolates were found to share a 95% identity with *T. vaginalis* and a 92% identity with *T. gallinae*.<sup>141</sup> We obtained 20 hits (template proteins) for this protein with MASCOT scores ( $M_s$ ) higher than 81 ( $p < 0.05$ ), the threshold value for significant match, see Table 5. The 4 proteins with higher MASCOT score were found to have a high similarity to G3PDH using a BLAST analysis; however, they are

Table 6. MASCOT Results for New Peptides

peptide	input sequence	MS			
		obsd	$M_r$ (expt)	$M_r$ (calc)	$\Delta$
P1	ksldgfalrv	878.4539	877.4466	877.4657	-0.0191
P2	ktlnnafgirn	1005.5297	1004.5224	1004.5403	-0.0179
P3	kvaingfgrigr	1160.6572	1159.6499	1159.6461	0.0038
P4	kvchglppks	907.4629	906.4556	906.4745	-0.0189
P5	kvlpnpegqgtlvkv	1351.729	1350.7217	1350.7507	-0.0289
P6	mvvkvaingfgr	1160.6572	1159.6499	1159.6712	-0.0213
P7	raagmniiptstgaaialpkv	1797.9801	1796.9728	1796.9706	0.0023
P8	rcadifhrleky	1288.6223	1287.615	1287.6394	-0.0243

Table 5. Top-20 Template Proteins in *T. gallinae* Found by MASCOT Search

protein	accession no.	mass	score	function
1	gi 123384282	39751	131	hypothetical protein TVAG_412780
2	gi 123470613	39758	131	hypothetical protein TVAG_475220
3	gi 154413810	39730	131	hypothetical protein TVAG_146910
4	gi 123423481	39722	115	hypothetical protein TVAG_347410
5	gi 2511550	35125	83	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
6	gi 432487	38614	83	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
7	gi 159107984	4269	63	hypothetical protein GL50803_115363
8	gi 123439459	52842	61	conserved hypothetical protein
9	gi 156938172	101242	60	SMC domain-containing protein
10	gi 120555683	48184	59	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
11	gi 194706618	36577	57	unknown
12	gi 194212530	52037	56	calcium-binding mitochondrial protein SCAAC-3
13	gi 16768590	55661	55	GM09639p
14	gi 126658767	11781	54	hypothetical protein CY0110_32435
15	gi 166030316	37983	54	cathepsin B-like protease
16	gi 123455578	18401	54	hypothetical protein TVAG_193800
17	gi 18410195	37652	53	HAP2C
18	gi 42572087	37751	53	HAP2C
19	gi 169187015	42001	53	ABC-2 type transporter
20	gi 124005885	45998	53	hypothetical protein M23134_03470



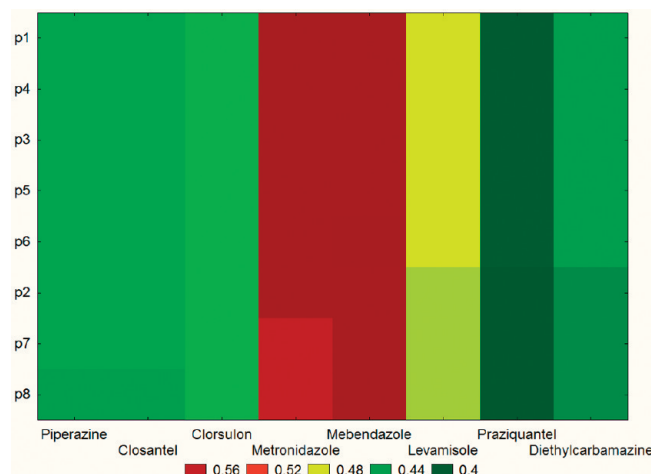
Table 7. MIND-BEST Results To Predict Peptides of New Protein

peptide	peptide sequence	S(dtp) %	drug	similar PDB	function
P1	kaevvdgkvtkd1	99.63	magnesium sulfate	1Y4E	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger trans membrane protein
		75.99	pamidronate		
		74.92	acarbose		
		73.25	mannitol		
		73.22	zoledronate		
P2	kcisnascctnclgpvakt1	99.41	magnesium sulfate	1BYV	Na <sup>+</sup> channel $\alpha$ -subunit
		75.76	pamidronate		
		74.70	acarbose		
		73.03	mannitol		
		73.00	zoledronate		
P3	ksldgflrv1	99.68	magnesium sulfate	1Y4E	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger trans membrane protein
		76.03	pamidronate		
		74.96	acarbose		
		73.30	mannitol		
		73.26	zoledronate		
P4	ktlnnafgim1	99.61	magnesium sulfate	1Y4E	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger trans membrane protein
		75.96	pamidronate		
		74.89	acarbose		
		73.23	mannitol		
		73.20	zoledronate		
P5	kvchglppks1	99.69	magnesium sulfate	1Y4E	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger trans membrane protein
		76.04	pamidronate		
		74.97	acarbose		
		73.31	mannitol		
		73.28	zoledronate		
P6	kvlpnpegqgtlvkv1	99.76	magnesium sulfate	1VMC	stromal cell-derived factor 1
		76.11	pamidronate		
		75.04	acarbose		
		73.38	mannitol		
		73.35	zoledronate		
P7	raagmniptstgaaialpkv1	99.10	magnesium sulfate	1KPF	protein kinase c interacting Protein
		75.45	pamidronate		
		74.38	acarbose		
		72.72	mannitol		
		72.68	zoledronate		
P8	rcadifhrlky1	98.83	magnesium sulfate	1Y4E	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger trans membrane protein
		75.18	pamidronate		
		74.11	acarbose		
		72.45	mannitol		
		72.42	zoledronate		

annotated as hypothetical proteins in MASCOT database. The maximum score obtained was 83, for a known protein with function annotation as G3PDH in MASCOT database, which matched protein gi|2511550 and protein gi|432487 of *T. vaginalis* with mass 35,125 and 38,614 Da, respectively. We chose the first two and a known protein with a MASCOT score higher than 81, whose function description is glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) enzyme.

Moreover, almost all relatively interesting matches found have also been recorded for the prediction of protein or hypothetical proteins. These aspects make it difficult to assign the sequence and function for the new protein but, at the same time, increase our interest in the PMF of this new query protein that does not match known templates. As mentioned in the introduction, the

PMF of this type of protein may be of great interest. We provide detailed information on the results of the MS analysis of the PMF of the new protein by means of the MALDI-TOF technique and MASCOT search engine, in Table 6. Similar combinations have been successfully used in the past to study *Trichinella* antigens<sup>142</sup> and possible *Leshmania* dynein proteins.<sup>143</sup> The table includes only the 8 most interesting peptides matching the MS of other proteins in the MASCOT search. We found an excellent match between the mass of the peptide detected and the mass of the template peptide recorded in the MASCOT database with a known sequence for all these peptides. Interestingly, we established an excellent match between MS signals not only for template protein 1 (higher  $M_s$ ) but also for the second template protein. Consequently, we decided to investigate the structure—



**Figure 6.** MIND-BEST + TWJ analysis from *T. gallinae* protein.

function relationships for all sequences of peptides found on the PMF of the new protein.

**LOMETS Study of Peptides Found on New Protein PMF.** Our main interest on the study of the peptides in the PMF of the new unknown proteins is to find which of them make a positive contribution to the ligand interaction. This may allow us to select peptides for drug design and/or obtain information for drug–target discovery. In this study we used the same 8 peptides found by PMF of the new protein. Unfortunately, we only have the sequences of the peptides and not the 3D structures. We therefore first obtained the optimal models of 3D folded structures using LOMETS,<sup>72</sup> an online web service for protein structure prediction for these peptides (see Figure 2). LOMETS generates 3D models by collecting high-scoring target-to-template alignments from 8 locally installed threading programs (FUGUE, HHsearch, MUSTER, PPA, PROSPECT2, SAM-T02, SPARKS, SP3). We summarized the results of structure prediction for these peptides in Table SM4 of Supporting Information. In this table we reported the rank (R), template (T), align length (AL), coverage (C), Z score (Zs), Seq\_id (Se), confidence score (Cs) (H = high, M = medium, L = low), and program (P) for the best 10 models selected from 160 models. In the Supporting Information file SM4.doc we showed details of the 3D structural models found, along with its Z score, as well as the confidence-score, for LOMETS Top 10 target-template alignments. For this, we used the eight peptide sequences obtained from *T. gallinae*. As a result, the server LOMETS obtained 80 models. These 80 models resulted in an available PDB file. In conclusion, a meta-server like LOMETS was a useful tool for protein structure predictions because LOMETS calculates different models for the plausible 3D structure of peptides, and this is very useful to predict the protein structure.

**MIND-BEST Prediction for Peptides of New Protein (mode 2).** After the calculation of different models for the plausible 3D structure of peptides, using the online web server LOMETS (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/LOMETS/>), we created models for the 3D structure of the peptides of this protein.<sup>72</sup> Finally, using MIND-BEST, we also predicted the interaction of these 8 peptides with all FDA drugs, more than 500 drugs giving as inputs the SMILE code of the drug. The 80 PDB files obtained from LOMETS were chosen as the best model of each peptide under LOMETS. We used these 8 PDB files in the MIND-BEST server against all drugs from the FDA. Table 7 presents the best five results of each peptide calculated with MIND-BEST, the server search in the protein data bank (PDB), the relation of our peptide with other PDB files, and the percentage of

similarity. Finally, the server predicts the drug that interacts with our peptide along with the percentage of drug–PDB similarity. According to Table 7, five out of the eight peptides, associated with 1Y4E protein, are a membrane protein that protects cells from intracellular acidification;<sup>144,145</sup> and the stimulation of its activity promotes cell growth and differentiation<sup>144</sup> and regulates sodium fluxes and cell volume after osmotic shrinkage.<sup>144,145</sup>

MIND-BEST predicts the drugs that interact with our peptides. Therefore, the predictions show that our peptides interact with magnesium sulfate, mannitol, pamidronate, acarbose, and zoledronate. All of these drugs were related to the absorption of minerals. For example, mannitol<sup>146</sup> is used as an osmotic diuretic agent and a weak renal vasodilator. These results show a possible interaction between 1Y4E and mannitol, and this can be useful for predicting new drug–protein interactions. The use of tools such as LOMETS and MIND-BEST are useful for predicting new interactions between drug and receptor and allows the design of more precise drugs and the discovery of new targets for any drug.

The LDA model has been used to study the prediction of peptides against antiparasitic drugs with known mechanism of action. In total, 9 drugs were used with 9 different mechanisms of action:

1. Levamisole, target ion-channel nicotinic acetylcholine receptor (nematodes).<sup>147–149</sup>
2. Piperazine, target ion-channel GABA receptors (in large intestinal nematodes).<sup>150</sup>
3. Ivermectin, target ion-channel GluCl<sup>−</sup> receptor (in nematodes and insect parasites).<sup>151,152</sup>
4. Praziquantel, target membrane ion-channel calcium permeability (in cestodes and trematodes).<sup>153</sup>
5. Mebendazole, target  $\beta$ -tubulin a (in nematodes, cestodes and trematodes).<sup>154</sup>
6. Closantel, proton ionophore against blood feeders: flukes, *Hemonchus contortus*, *Oestrus ovis*.<sup>155</sup>
7. Diamfenetide, target malate metabolism (in immature *Fasciola hepatica*).<sup>156,157</sup>
8. Clorsulon, target phosphoglycerate kinase and mutase.<sup>158</sup>
9. Diethylcarbamazina, target arachidonic acid metabolism and host immunity, effective against *Filaria*.<sup>159</sup>

We used the best LDA model found to predict the possible interaction of these drugs with the 8 peptides of the protein isolated from *T. gallinae*; see Figure 6. This figure shows a TWJ analysis of the DTP scores predicted with MIND-BEST for all the peptides with respect to the list of nine representative drugs. We can observe very low values and variability of the scores, indicating low tendency to bind these drugs. As a result, we can see that MIND-BEST does not predict significant contribution to DTP formation between the peptides of relevant protein and the nine drugs representative of nine different mechanisms of action. These results coincide for all peptide investigated (100%) with those found by MASCOT. In conclusion, both MIND-BEST and MASCOT predict very low propensity of these peptides to be involved in some of the nine previously listed antiparasite drug mechanisms. This could indicate that it may be interesting to go into depth on this protein, using it as a target for drugs with a mechanism different from the most representative ones of antiparasite drugs.

## CONCLUSIONS

Combining MARCH-INSIDE approach and LDA, it is possible to search for an mt-QSAR classifier that can predict with accuracy >94% the probability of drugs to bind more than 300 different drug target proteins approved by the U.S. FDA. This LDA classifier was

implemented into a web server called MIND-BEST that may be used online and free by the research community to carry out public research. The server is also useful to carry out data mining of PDB automatically in order to discover new targets for any drug giving only the SMILE code of the drug and the PDB id of the protein as inputs. We can also predict the interactions with specific drugs of peptides or protein 3D structures generated by LOMETS.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ■ Supporting Information

This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*(H.G.-D.) Fax: +34-981594912. Email: [gonzalezdiazh@yahoo.es](mailto:gonzalezdiazh@yahoo.es) or [humberto.gonzalez@usc.es](mailto:humberto.gonzalez@usc.es). (C.R.M.) Email: [muntisa@gmail.com](mailto:muntisa@gmail.com).

## ■ ACKNOWLEDGMENT

All authors are grateful for the kind attention and useful comments from the editor Prof. Martin W. McIntosh as well as the three unknown reviewers. H.G.-D. and C.R.M. acknowledge sponsorship from the Isidro Parga Pondal (IPP) research program, funded by Xunta de Galicia and the European Social Fund (ESF). F.P.P. acknowledges sponsorship from the Angeles Alvariño research program, sponsored by Xunta de Galicia and the European Social Fund (ESF). N.A. acknowledges a research position grant at the University of Santiago de Compostela from the FPU program, Xunta de Galicia. All authors acknowledge the Project 07CSA008203PR. The authors would like to dedicate the present work to Prof. F. Orallo (in memoriam) for his kind attention, support, and friendship.

## ■ REFERENCES

- (1) Yamanishi, Y.; Araki, M.; Gutteridge, A.; Honda, W.; Kanehisa, M. Prediction of drug–target interaction networks from the integration of chemical and genomic spaces. *Bioinformatics* **2008**, *24* (13), i232–40.
- (2) Giuliani, A. Collective motions and specific effectors: a statistical mechanics perspective on biological regulation. *BMC Genomics* **2010**, *11* (Suppl 1), S2.
- (3) Dhar, P. K.; Giuliani, A. Laws of biology: why so few? *Syst Synth. Biol.* **2010**, *4* (1), 7–13.
- (4) Bornholdt, S.; Schuster, H. G., *Handbook of Graphs and Complex Networks: From the Genome to the Internet*; Wiley-VCH GmbH & Co. KGa.: Weinheim, 2003.
- (5) Estrada, E. Virtual identification of essential proteins within the protein interaction network of yeast. *Proteomics* **2006**, *6* (1), 35–40.
- (6) Estrada, E. Protein bipartivity and essentiality in the yeast protein–protein interaction network. *J. Proteome Res.* **2006**, *5* (9), 2177–84.
- (7) Réka, A.; Barabasi, A.-L. Statistical mechanics of complex networks. *Rev. Mod. Phys.* **2002**, *74* (1), 47–97.
- (8) Barabasi, A. L.; Oltvai, Z. N. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5* (2), 101–13.
- (9) Barabasi, A. L. Network medicine—from obesity to the “disease”. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357* (4), 404–7.
- (10) González-Díaz, H.; Vilar, S.; Santana, L.; Uriarte, E. Medicinal chemistry and bioinformatics—current trends in drugs discovery with networks topological indices. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7* (10), 1025–39.
- (11) Giuliani, A.; Di Paola, L.; Setola, R. Proteins as networks: a mesoscopic approach using haemoglobin molecule as case study. *Curr. Proteomics* **2009**, *6* (4), 235–45.

- (12) Krishnan, A.; Zbilut, J. P.; Tomita, M.; Giuliani, A. Proteins as networks: usefulness of graph theory in protein science. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2008**, *9* (1), 28–38.
- (13) Krishnan, A.; Giuliani, A.; Zbilut, J. P.; Tomita, M. Implications from a network-based topological analysis of ubiquitin unfolding simulations. *PLoS One* **2008**, *3* (5), e2149.
- (14) Palumbo, M. C.; Colosimo, A.; Giuliani, A.; Farina, L. Essentiality is an emergent property of metabolic network wiring. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (13), 2485–9.
- (15) Krishnan, A.; Giuliani, A.; Zbilut, J. P.; Tomita, M. Network scaling invariants help to elucidate basic topological principles of proteins. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (10), 3924–34.
- (16) Krishnan, A.; Giuliani, A.; Tomita, M. Indeterminacy of reverse engineering of gene regulatory networks: the curse of gene elasticity. *PLoS One* **2007**, *2* (6), e562.
- (17) Tun, K.; Dhar, P. K.; Palumbo, M. C.; Giuliani, A. Metabolic pathways variability and sequence/networks comparisons. *BMC Bioinf.* **2006**, *7*, 24.
- (18) Vilar, S.; Gonzalez-Diaz, H.; Santana, L.; Uriarte, E. A network-QSAR model for prediction of genetic-component biomarkers in human colorectal cancer. *J. Theor. Biol.* **2009**, *261* (3), 449–58.
- (19) Mazurie, A.; Bonchev, D.; Schwikowski, B.; Buck, G. A. Phylogenetic distances are encoded in networks of interacting pathways. *Bioinformatics* **2008**, *24* (22), 2579–85.
- (20) Thomas, S.; Bonchev, D. A survey of current software for network analysis in molecular biology. *Hum. Genomics* **2010**, *4* (5), 353–60.
- (21) Managbanag, J. R.; Witten, T. M.; Bonchev, D.; Fox, L. A.; Tsuchiya, M.; Kennedy, B. K.; Kaeberlein, M. Shortest-path network analysis is a useful approach toward identifying genetic determinants of longevity. *PLoS One* **2008**, *3* (11), e3802.
- (22) Bonchev, D.; Thomas, S.; Apte, A.; Kier, L. B. Cellular automata modelling of biomolecular networks dynamics. *SAR QSAR Environ. Res.* **2010**, *21* (1), 77–102.
- (23) Bonchev, D.; Trinajstić, N. Overall molecular descriptors. 3. Overall Zagreb indices. *SAR QSAR Environ. Res.* **2001**, *12* (1–2), 213–36.
- (24) Zbilut, J. P.; Giuliani, A.; Colosimo, A.; Mitchell, J. C.; Colafranceschi, M.; Marwan, N.; Webber, C. L., Jr.; Uversky, V. N. Charge and hydrophobicity patterning along the sequence predicts the folding mechanism and aggregation of proteins: a computational approach. *J. Proteome Res.* **2004**, *3* (6), 1243–53.
- (25) Zbilut, J. P.; Colosimo, A.; Conti, F.; Colafranceschi, M.; Manetti, C.; Valerio, M.; Webber, C. L., Jr.; Giuliani, A. Protein aggregation/folding: the role of deterministic singularities of sequence hydrophobicity as determined by nonlinear signal analysis of acylphosphatase and Abeta(1–40). *Biophys. J.* **2003**, *85* (6), 3544–57.
- (26) Nunez, M. B.; Maguna, F. P.; Okulik, N. B.; Castro, E. A. QSAR modeling of the MAO inhibitory activity of xanthenes derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (22), S611–7.
- (27) Terada, M.; Inaba, M.; Yano, Y.; Hasuma, T.; Nishizawa, Y.; Morii, H.; Otani, S. Growth-inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. *Bone* **1998**, *22* (1), 17–23.
- (28) Freund, J. A.; Poschel, T., *Stochastic processes in physics, chemistry, and biology*. In *Lecture Notes in Physics*, Springer-Verlag: Berlin, Germany, 2000.
- (29) González-Díaz, H.; González-Díaz, Y.; Santana, L.; Ubeira, F. M.; Uriarte, E. Proteomics, networks and connectivity indices. *Proteomics* **2008**, *8*, 750–78.
- (30) Zhao, C. J.; Dai, Q. Y. [Recent advances in study of antinociceptive conotoxins]. *Yao Xue Xue Bao* **2009**, *44* (6), S61–5.
- (31) Jacob, R. B.; McDougal, O. M. The M-superfamily of conotoxins: a review. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67* (1), 17–27.
- (32) Concu, R.; Dea-Ayuela, M. A.; Perez-Montoto, L. G.; Prado-Prado, F. J.; Uriarte, E.; Bolas-Fernandez, F.; Podda, G.; Pazos, A.; Munteanu, C. R.; Ubeira, F. M.; Gonzalez-Diaz, H. 3D entropy and moments prediction of enzyme classes and experimental-theoretic study of peptide fingerprints in Leishmania parasites. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1794* (12), 1784–94.



- (33) Torrens, F.; Castellano, G. Topological charge-transfer indices: from small molecules to proteins. *Curr. Proteomics* **2009**, 204–13.
- (34) Vázquez, J. M.; Aguiar, V.; Seoane, J. A.; Freire, A.; Serantes, J. A.; Dorado, J.; Pazos, A.; Munteanu, C. R. Star graphs of protein sequences and proteome mass spectra in cancer prediction. *Curr. Proteomics* **2009**, 6 (4), 275–88.
- (35) Ivanciuc, O. Weka machine learning for predicting the phospholipidosis inducing potential. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8 (18), 1691–709.
- (36) Gonzalez-Diaz, H.; Prado-Prado, F.; Ubeira, F. M. Predicting antimicrobial drugs and targets with the MARCH-INSIDE approach. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8 (18), 1676–90.
- (37) Duardo-Sanchez, A.; Patlewicz, G.; Lopez-Diaz, A. Current topics on software use in medicinal chemistry: intellectual property, taxes, and regulatory issues. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8 (18), 1666–75.
- (38) Wang, J. F.; Wei, D. Q.; Chou, K. C. Drug candidates from traditional chinese medicines. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8 (18), 1656–65.
- (39) Helguera, A. M.; Combes, R. D.; Gonzalez, M. P.; Cordeiro, M. N. Applications of 2D descriptors in drug design: a DRAGON tale. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8 (18), 1628–55.
- (40) Gonzalez, M. P.; Teran, C.; Saiz-Urra, L.; Teijeira, M. Variable selection methods in QSAR: an overview. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8 (18), 1606–27.
- (41) Caballero, J.; Fernandez, M. Artificial neural networks from MATLAB in medicinal chemistry. Bayesian-regularized genetic neural networks (BRGNN): application to the prediction of the antagonistic activity against human platelet thrombin receptor (PAR-1). *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8 (18), 1580–605.
- (42) Wang, J. F.; Wei, D. Q.; Chou, K. C. Pharmacogenomics and personalized use of drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8 (18), 1573–9.
- (43) Vilar, S.; Cozza, G.; Moro, S. Medicinal chemistry and the molecular operating environment (MOE): application of QSAR and molecular docking to drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8 (18), 1555–72.
- (44) Gonzalez-Diaz, H. Quantitative studies on structure-activity and structure-property relationships (QSAR/QSPR). *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8 (18), 1554.
- (45) Gonzalez-Diaz, H. Network topological indices, drug metabolism, and distribution. *Curr. Drug Metab.* **2010**, 11 (4), 283–4.
- (46) Khan, M. T. Predictions of the ADMET properties of candidate drug molecules utilizing different QSAR/QSPR modelling approaches. *Curr. Drug Metab.* **2010**, 11 (4), 285–95.
- (47) Mrabet, Y.; Semmar, N. Mathematical methods to analysis of topology, functional variability and evolution of metabolic systems based on different decomposition concepts. *Curr. Drug Metab.* **2010**, 11 (4), 315–41.
- (48) Martinez-Romero, M.; Vazquez-Naya, J. M.; Rabunal, J. R.; Pita-Fernandez, S.; Macenlle, R.; Castro-Alvarino, J.; Lopez-Roses, L.; Ulla, J. L.; Martinez-Calvo, A. V.; Vazquez, S.; Pereira, J.; Porto-Pazos, A. B.; Dorado, J.; Pazos, A.; Munteanu, C. R. Artificial intelligence techniques for colorectal cancer drug metabolism: ontology and complex network. *Curr. Drug Metab.* **2010**, 11 (4), 347–68.
- (49) Zhong, W. Z.; Zhan, J.; Kang, P.; Yamazaki, S. Gender specific drug metabolism of PF-02341066 in rats—role of sulfoconjugation. *Curr. Drug Metab.* **2010**, 11 (4), 296–306.
- (50) Wang, J. F.; Chou, K. C. Molecular modeling of cytochrome P450 and drug metabolism. *Curr. Drug Metab.* **2010**, 11 (4), 342–6.
- (51) Gonzalez-Diaz, H.; Duardo-Sanchez, A.; Ubeira, F. M.; Prado-Prado, F.; Perez-Montoto, L. G.; Concu, R.; Podda, G.; Shen, B. Review of MARCH-INSIDE & complex networks prediction of drugs: ADMET, anti-parasite activity, metabolizing enzymes and cardiotoxicity proteome biomarkers. *Curr. Drug Metab.* **2010**, 11 (4), 379–406.
- (52) Garcia, I.; Diop, Y. F.; Gomez, G. QSAR & complex network study of the HMGR inhibitors structural diversity. *Curr. Drug Metab.* **2010**, 11 (4), 307–14.
- (53) Chou, K. C. Graphic rule for drug metabolism systems. *Curr. Drug Metab.* **2010**, 11 (4), 369–78.
- (54) Concu, R.; Podda, G.; Ubeira, F. M.; Gonzalez-Diaz, H. Review of QSAR models for enzyme classes of drug targets: theoretical background and applications in parasites, hosts, and other organisms. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (24), 2710–23.
- (55) Estrada, E.; Molina, E.; Nodarse, D.; Uriarte, E. Structural contributions of substrates to their binding to P-glycoprotein. A TOPS-MODE approach. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (24), 2676–709.
- (56) Garcia, I.; Fall, Y.; Gomez, G. QSAR, docking, and CoMFA studies of GSK3 inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (24), 2666–75.
- (57) González-Díaz, H. QSAR and complex networks in pharmaceutical design, microbiology, parasitology, toxicology, cancer, and neurosciences. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (24), 2598–600.
- (58) Gonzalez-Diaz, H.; Romaris, F.; Duardo-Sanchez, A.; Perez-Mototo, L. G.; Prado-Prado, F.; Patlewicz, G.; Ubeira, F. M. Predicting drugs and proteins in parasite infections with topological indices of complex networks: theoretical backgrounds, applications, and legal issues. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (24), 2737–64.
- (59) Marrero-Ponce, Y.; Casanola-Martin, G. M.; Khan, M. T.; Torrens, F.; Rescigno, A.; Abad, C. Ligand-based computer-aided discovery of tyrosinase inhibitors. Applications of the TOMOCOMD-CARDD method to the elucidation of new compounds. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (24), 2601–24.
- (60) Munteanu, C. R.; Fernandez-Blanco, E.; Seoane, J. A.; Izquierdo-Novo, P.; Rodriguez-Fernandez, J. A.; Prieto-Gonzalez, J. M.; Rabunal, J. R.; Pazos, A. Drug discovery and design for complex diseases through QSAR computational methods. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (24), 2640–55.
- (61) Roy, K.; Ghosh, G. Exploring QSARs with extended topological atom (ETA) indices for modeling chemical and drug toxicity. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (24), 2625–39.
- (62) Speck-Planche, A.; Scotti, M. T.; de Paulo-Emerenciano, V. Current pharmaceutical design of antituberculosis drugs: future perspectives. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (24), 2656–65.
- (63) Vazquez-Naya, J. M.; Martinez-Romero, M.; Porto-Pazos, A. B.; Novoa, F.; Valladares-Ayerbes, M.; Pereira, J.; Munteanu, C. R.; Dorado, J. Ontologies of drug discovery and design for neurology, cardiology and oncology. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (24), 2724–36.
- (64) Yildirim, M. A.; Goh, K. I.; Cusick, M. E.; Barabasi, A. L.; Vidal, M. Drug-target network. *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25 (10), 1119–26.
- (65) Vina, D.; Uriarte, E.; Orallo, F.; Gonzalez-Diaz, H. Alignment-free prediction of a drug-target complex network based on parameters of drug connectivity and protein sequence of receptors. *Mol. Pharm.* **2009**, 6 (3), 825–35.
- (66) Todeschini, R.; Consonni, V. *Handbook of Molecular Descriptors*; Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
- (67) Agüero-Chapin, G.; Varona-Santos, J.; de la Riva, G. A.; Antunes, A.; Gonzalez-Villa, T.; Uriarte, E.; Gonzalez-Diaz, H. Alignment-free prediction of polygalacturonases with pseudofolding topological indices: experimental isolation from *coffea arabica* and prediction of a new sequence. *J. Proteome Res.* **2009**, 8 (4), 2122–8.
- (68) Concu, R.; Dea-Ayuela, M. A.; Perez-Montoto, L. G.; Bolas-Fernandez, F.; Prado-Prado, F. J.; Podda, G.; Uriarte, E.; Ubeira, F. M.; Gonzalez-Diaz, H. Prediction of enzyme classes from 3D structure: a general model and examples of experimental-theoretic scoring of peptide mass fingerprints of *Leishmania* proteins. *J. Proteome Res.* **2009**, 8 (9), 4372–82.
- (69) Gonzalez-Diaz, H.; Saiz-Urra, L.; Molina, R.; Santana, L.; Uriarte, E. A model for the recognition of protein kinases based on the entropy of 3D van der Waals interactions. *J. Proteome Res.* **2007**, 6 (2), 904–8.
- (70) Munteanu, C. R.; Vazquez, J. M.; Dorado, J.; Sierra, A. P.; Sanchez-Gonzalez, A.; Prado-Prado, F. J.; Gonzalez-Diaz, H. Complex network spectral moments for ATCUN motif DNA cleavage: first predictive study on proteins of human pathogen parasites. *J. Proteome Res.* **2009**, 8 (11), 5219–28.
- (71) Rodriguez-Soca, Y.; Munteanu, C. R.; Prado-Prado, F. J.; Dorado, J.; Pazos Sierra, A.; Gonzalez-Diaz, H. Trypano-PPI: a web server for prediction of unique targets in trypanosome proteome by



using electrostatic parameters of protein-protein interactions. *J. Proteome Res.* **2009**, *9*, 1182–90.

(72) Wu, S.; Zhang, Y. LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (10), 3375–82.

(73) Santana, L.; Gonzalez-Diaz, H.; Quezada, E.; Uriarte, E.; Yanez, M.; Vina, D.; Orallo, F. Quantitative structure-activity relationship and complex network approach to monoamine oxidase a and B inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (21), 6740–51.

(74) Santana, L.; Uriarte, E.; González-Díaz, H.; Zagotto, G.; Soto-Otero, R.; Mendez-Alvarez, E. A QSAR model for in silico screening of MAO-A inhibitors. Prediction, synthesis, and biological assay of novel coumarins. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (3), 1149–56.

(75) González-Díaz, H.; Prado-Prado, F.; Ubeira, F. M. Predicting antimicrobial drugs and targets with the MARCH INSIDE approach. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8* (18), 1676–90.

(76) Concu, R.; Podda, G.; Uriarte, E.; Gonzalez-Diaz, H. Computational chemistry study of 3D-structure-function relationships for enzymes based on Markov models for protein electrostatic, HINT, and van der Waals potentials. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (9), 1510–20.

(77) STATISTICA, data analysis software system, version 6.0; StatSoft, Inc.: Tulsa, OK, 2002; www.statsoft.com.Statsoft.

(78) Bernstein, F. C.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J.; Meyer, E. F., Jr.; Brice, M. D.; Rodgers, J. R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **1977**, *112* (3), 535–42.

(79) Shi, J.; Blundell, T. L.; Mizuguchi, K. FUGUE: sequence-structure homology recognition using environmentspecific substitution tables and structure-dependent gap penalties. *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 243–57.

(80) Soding, J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* **2005**, *21* (7), 951–60.

(81) Wu, S.; Zhang, Y. MUSTER: Improving protein sequence profile-profile alignments by using multiple sources of structure information. *Proteins* **2008**, *72* (2), 547–56.

(82) Xu, Y.; Xu, D. Protein threading using PROSPECT: design and evaluation. *Proteins* **2000**, *40*, 343–54.

(83) Karplus, K.; Barrett, C.; Hughey, R. Hidden Markov models for detecting remote protein homologies. *Bioinformatics* **1998**, *14* (10), 846–56.

(84) Zhou, H.; Zhou, Y. Fold recognition by combining sequence profiles derived from evolution and from depth-dependent structural alignment of fragments. *Proteins* **2005**, *58*, 321–28.

(85) Zhou, H.; Zhou, Y. Single-body residue-level knowledge-based energy score combined with sequence-profile and secondary structure information for fold recognition. *Proteins* **2004**, *55*, 1005–13.

(86) Yanez, M.; Fraiz, N.; Cano, E.; Orallo, F. Inhibitory effects of cis- and trans-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *344* (2), 688–95.

(87) Sansano-Maestre, J.; Garijo-Toledo, M.; Gómez-Muñoz, M. Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey. *Avian Pathol.* **2009**, *38* (3), 201–7.

(88) Shevchenko, A.; Jensen, O. N.; Podtelejnikov, A. V.; Sagliocco, F.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mortensen, P.; Shevchenko, A.; Boucherie, H.; Mann, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93* (25), 14440–5.

(89) Hirosawa, M.; Hoshida, M.; Ishikawa, M.; Toya, T. MASCOT: multiple alignment system for protein sequences based on three-way dynamic programming. *Comput. Appl. Biosci.* **1993**, *9* (2), 161–7.

(90) Yang, C. G.; Granite, S. J.; Van Eyk, J. E.; Winslow, R. L. MASCOT HTML and XML parser: an implementation of a novel object model for protein identification data. *Proteomics* **2006**, *6* (21), 5688–93.

(91) Koenig, T.; Menze, B. H.; Kirchner, M.; Monigatti, F.; Parker, K. C.; Patterson, T.; Steen, J. J.; Hamprecht, F. A.; Steen, H. Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (9), 3708–17.

(92) Brosch, M.; Yu, L.; Hubbard, T.; Choudhary, J. Accurate and sensitive peptide identification with Mascot Percolator. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (6), 3176–81.

(93) Chen, Y.; Zhang, J.; Xing, G.; Zhao, Y. Mascot-derived false positive peptide identifications revealed by manual analysis of tandem mass spectra. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (6), 3141–7.

(94) Ivanciuc, O.; Oezguen, N.; Mathura, V. S.; Schein, C. H.; Xu, Y.; Braun, W. Using property based sequence motifs and 3D modeling to determine structure and functional regions of proteins. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11* (5), 583–93.

(95) Schein, C. H.; Ivanciuc, O.; Braun, W. Common physico-chemical properties correlate with similar structure of the IgE epitopes of peanut allergens. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (22), 8752–9.

(96) Alvarez-Ginarte, Y. M.; Marrero-Ponce, Y.; Ruiz-Garcia, J. A.; Montero-Cabrera, L. A.; Vega, J. M.; Noheda Marin, P.; Crespo-Otero, R.; Zaragoza, F. T.; Garcia-Domenech, R. Applying pattern recognition methods plus quantum and physico-chemical molecular descriptors to analyze the anabolic activity of structurally diverse steroids. *J. Comput. Chem.* **2007**, *29*, 317–33.

(97) Morales, A. H.; Rodríguez-Borges, J. E.; García-Mera, X.; Fernández, F.; Dias-Sueiro-Cordeiro, M. N. Probing the anticancer activity of nucleoside analogues: a QSAR model approach using an internally consistent training set. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1537–45.

(98) Mascarenhas, N. M.; Ghoshal, N. Combined ligand and structure based approaches for narrowing on the essential physicochemical characteristics for CDK4 inhibition. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48* (7), 1325–36.

(99) Chen, X.; Fang, Y.; Yao, L.; Chen, Y.; Xu, H. Does drug-target have a likeness? *Methods Inf. Med.* **2007**, *46* (3), 360–6.

(100) Bleakley, K.; Yamanishi, Y. Supervised prediction of drug-target interactions using bipartite local models. *Bioinformatics* **2009**, *25* (18), 2397–403.

(101) Bas, D. C.; Rogers, D. M.; Jensen, J. H. Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. *Proteins* **2008**, *73* (3), 765–83.

(102) Li, Q.; Lai, L. Prediction of potential drug targets based on simple sequence properties. *BMC Bioinf.* **2007**, *8*, 353.

(103) Yang, C. Y.; Sun, H.; Chen, J.; Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, S. Importance of ligand reorganization free energy in protein-ligand binding-affinity prediction. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (38), 13709–21.

(104) Vijayan, R. S.; Bera, I.; Prabhu, M.; Saha, S.; Ghoshal, N. Combinatorial library enumeration and lead hopping using comparative interaction fingerprint analysis and classical 2D QSAR methods for seeking novel GABA(A)  $\alpha$ (3) modulators. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (11), 2498–511.

(105) Pham, T. A.; Jain, A. N. Parameter estimation for scoring protein-ligand interactions using negative training data. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (20), 5856–68.

(106) Raha, K.; Peters, M. B.; Wang, B.; Yu, N.; Wollacott, A. M.; Westerhoff, L. M.; Merz, K. M., Jr. The role of quantum mechanics in structure-based drug design. *Drug Discovery Today* **2007**, *12* (17–18), 725–31.

(107) Zhang, S.; Golbraikh, A.; Tropsha, A. Development of quantitative structure-binding affinity relationship models based on novel geometrical chemical descriptors of the protein-ligand interfaces. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (9), 2713–24.

(108) Michel, J.; Verdonk, M. L.; Essex, J. W. Protein-ligand binding affinity predictions by implicit solvent simulations: a tool for lead optimization? *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (25), 7427–39.

(109) Naumann, T.; Matter, H. Structural classification of protein kinases using 3D molecular interaction field analysis of their ligand binding sites: target family landscapes. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (12), 2366–78.

(110) Shen, H. B.; Chou, K. C. PseAAC: A flexible web server for generating various kinds of protein pseudo amino acid composition. *Anal. Biochem.* **2008**, *373* (2), 386–8.

(111) Shen, H. B.; Chou, K. C. Nuc-PLoc: a new web-server for predicting protein subnuclear localization by fusing PseAA composition and PsePSSM. *Protein Eng., Des. Sel.* **2007**, *20* (11), 561–7.

- (112) Chou, K. C.; Shen, H. B. MemType-2L: A Web server for predicting membrane proteins and their types by incorporating evolution information through Pse-PSSM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *360*, 339–45.
- (113) Chou, K. C.; Shen, H. B. Cell-PLoc: a package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Nat. Protoc.* **2008**, *3* (2), 153–62.
- (114) Chou, K. C. Prediction of G-protein-coupled receptor classes. *J. Proteome Res.* **2005**, *4* (4), 1413–8.
- (115) Chou, K. C.; Elrod, D. W. Bioinformatical analysis of G-protein-coupled receptors. *J. Proteome Res.* **2002**, *1* (5), 429–33.
- (116) Chou, K. C.; Elrod, D. W. Prediction of enzyme family classes. *J. Proteome Res.* **2003**, *2* (2), 183–90.
- (117) Chou, K. C.; Shen, H. B. Predicting eukaryotic protein subcellular location by fusing optimized evidence-theoretic K-nearest neighbor classifiers. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1888–97.
- (118) Chou, K. C.; Shen, H. B. Large-scale predictions of Gram-negative bacterial protein subcellular locations. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 3420–8.
- (119) Xie, L.; Xie, L.; Bourne, P. E. A unified statistical model to support local sequence order independent similarity searching for ligand-binding sites and its application to genome-based drug discovery. *Bioinformatics* **2009**, *25* (12), i305–12.
- (120) Wang, Y.; Bajorath, J. Development of a compound class-directed similarity coefficient that accounts for molecular complexity effects in fingerprint searching. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (6), 1369–76.
- (121) Geppert, H.; Humrich, J.; Stumpfe, D.; Gartner, T.; Bajorath, J. Ligand prediction from protein sequence and small molecule information using support vector machines and fingerprint descriptors. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (4), 767–79.
- (122) Campillos, M.; Kuhn, M.; Gavin, A. C.; Jensen, L. J.; Bork, P. Drug target identification using side-effect similarity. *Science* **2008**, *321* (5886), 263–6.
- (123) Thimm, M.; Goede, A.; Hougard, S.; Preissner, R. Comparison of 2D similarity and 3D superposition. Application to searching a conformational drug database. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44* (5), 1816–22.
- (124) Lam, R. L.; Welch, W. J. Comparison of methods based on diversity and similarity for molecule selection and the analysis of drug discovery data. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *275*, 301–16.
- (125) Good, A. C.; Hodgkin, E. E.; Richards, W. G. Similarity screening of molecular data sets. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1992**, *6* (5), 513–20.
- (126) Lecht, S.; Haroutiunian, S.; Hoffman, A.; Lazarovici, P. Rasagiline—a novel MAO B inhibitor in Parkinson's disease therapy. *Ther. Clin. Risk Manage.* **2007**, *3* (3), 467–74.
- (127) Youdim, M. B.; Wadia, A.; Tatton, W.; Weinstock, M. The anti-Parkinson drug rasagiline and its cholinesterase inhibitor derivatives exert neuroprotection unrelated to MAO inhibition in cell culture and in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *939*, 450–8.
- (128) Guillon, J.; Hebert, G.; Dallemagne, P.; Leger, J. M.; Vidaillac, C.; The, C.; Lisowski, V.; Rault, S.; Demotes-Mainard, J.; Jarry, C. Synthesis and initial results for MAO-B inhibition by new N-propargyl-3-pyrrol-1-ylindanamine derivatives, analogues of rasagiline. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2003**, *18* (2), 147–53.
- (129) Gordaliza, M.; Dallemagne, P.; Rault, S.; Robba, M. *Analisis Quimico* **1989**, No. 85, 66–8.
- (130) Youdim, M. B. H.; Finberg, J. P. M.; Levy, R.; Sterling, J.; Lerner, D.; Berger-Paskin, T.; Yellin, F. U.S. patent US5453446, 1995.
- (131) Herzig, Y.; Lerman, L.; Goldenberg, W.; Lerner, D.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A. Hydroxy-1-aminoindans and derivatives: preparation, stability, and reactivity. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (11), 4130–40.
- (132) Sakeda, M.; Ichikawa, S.; Matsuda, A.; Shuto, S. The first radical method for the introduction of an ethynyl group using a silicon tether and its application to the synthesis of 2'-deoxy-2'-C-ethynylnucleosides. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (9), 3465–75.
- (133) Narcisi, E. M.; Sevolan, M.; Honigberg, B. M. Pathologic changes in pigeons infected with a virulent *Trichomonas gallinae* strain (Eigberg). *Avian Diseases* **1991**, *35*, 55–61.
- (134) Harmon, W. H.; Clark, W. A.; Hawbecker, A. C.; Stafford, M. *Trichomonas gallinae* in columbiform birds from Galapagos islands. *J. Wildlife Dis.* **1987**, *23*, 492–4.
- (135) Real, J.; Mañosa, S.; Muñoz, E. Trichomoniasis in a Bonelli's eagle population in Spain. *J. Wildlife Dis.* **2000**, *36*, 64–70.
- (136) Tarze, A.; Deniaud, A.; Le Bras, M.; Maillier, E.; Molle, D.; Larochette, N.; Zamzami, N.; Jan, G.; Kroemer, G.; Brenner, C. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* **2007**, *26* (18), 2606–20.
- (137) Zheng, L.; Roeder, R. G.; Luo, Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* **2003**, *114* (2), 255–66.
- (138) Hara, M. R.; Thomas, B.; Cascio, M. B.; Bae, B. I.; Hester, L. D.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; Sawa, A.; Snyder, S. H. Neuroprotection by pharmacologic blockade of the GAPDH death cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103* (10), 3887–9.
- (139) Lei, Z.; Elmer, A. M.; Watson, B. S.; Dixon, R. A.; Mendes, P. J.; Sumner, L. W. A two-dimensional electrophoresis proteomic reference map and systematic identification of 1367 proteins from a cell suspension culture of the model legume *Medicago truncatula*. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4* (11), 1812–25.
- (140) Giddings, M. C.; Shah, A. A.; Gesteland, R.; Moore, B. Genome-based peptide fingerprint scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100* (1), 20–5.
- (141) Gerhold, R. W.; Yabsley, M. J.; Smith, A. J.; Ostergaard, E.; Mannan, W.; Cann, J. D.; Fischer, J. R. Molecular characterization of the *Trichomonas gallinae* morphologic complex in the United States. *J. Parasitol.* **2008**, *94* (6), 1335–41.
- (142) Dea-Ayuela, M. A.; Bolás-Fernández, F. Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry for the identification of species-specific *Trichinella* antigens. *Vet. Parasitol.* **2005**, *132*, 43–9.
- (143) Dea-Ayuela, M. A.; Perez-Castillo, Y.; Meneses-Marcel, A.; Ubeira, F. M.; Bolas-Fernandez, F.; Chou, K. C.; Gonzalez-Diaz, H. HP-Lattice QSAR for dynein proteins: experimental proteomics (2D-electrophoresis, mass spectrometry) and theoretic study of a *Leishmania infantum* sequence. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (16), 7770–6.
- (144) Grinstein, S.; Rotin, D.; Mason, M. J. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *988* (1), 73–97.
- (145) Pouyssegur, J.; Sardet, C.; Franchi, A.; L'Allemain, G.; Paris, S. A specific mutation abolishing Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81* (15), 4833–7.
- (146) Molosh, A. I.; Johnson, P. L.; Fitz, S. D.; Dimicco, J. A.; Herman, J. P.; Shekhar, A. Changes in central sodium and not osmolarity or lactate induce panic-like responses in a model of panic disorder. *Neuropsychopharmacology* **2010**, *35* (6), 1333–47.
- (147) Evans, A. M.; Martin, R. J. Activation and cooperative multi-ion block of single nicotinic-acetylcholine channel currents of *Ascaris* muscle by the tetrahydropyrimidine anthelmintic, morantel. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *118* (5), 1127–40.
- (148) Martin, R. J. Neuromuscular transmission in nematode parasites and antinematodal drug action. *Pharmacol. Ther.* **1993**, *58* (1), 13–50.
- (149) Robertson, S. J.; Martin, R. J. Levamisole-activated single-channel currents from muscle of the nematode parasite *Ascaris suum*. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *108* (1), 170–8.
- (150) Martin, R. J. gamma-Aminobutyric acid- and piperazine-activated single-channel currents from *Ascaris suum* body muscle. *Br. J. Pharmacol.* **1985**, *84* (2), 445–61.
- (151) Martin, R. J. An electrophysiological preparation of *Ascaris suum* pharyngeal muscle reveals a glutamate-gated chloride channel sensitive to the avermectin analogue, milbemycin D. *Parasitology* **1996**, *112* (Pt 2), 247–52.
- (152) Cully, D. F.; Wilkinson, H.; Vassiliatis, D. K.; Etter, A.; Arena, J. P. Molecular biology and electrophysiology of glutamate-gated

chloride channels of invertebrates. *Parasitology* **1996**, *113* (Suppl), S191–200.

(153) Redman, C. A.; Robertson, A.; Fallon, P. G.; Modha, J.; Kusel, J. R.; Doenhoff, M. J.; Martin, R. J. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol. Today* **1996**, *12* (1), 14–20.

(154) Roos, M. H.; G., K. M. S.; N., G. W. New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitol. Today* **1995**, *11* (4), 148–50.

(155) McKellar, Q. A.; Bogan, J. A.; von Fellenberg, R. L.; Ludwig, B.; Cawley, G. D. Pharmacokinetic, biochemical and tolerance studies on carprofen in the horse. *Equine Vet. J.* **1991**, *23* (4), 280–4.

(156) Edwards, S. R.; Campbell, A. J.; Sheers, M.; Moore, R. J.; Montague, P. E. Protection of *Fasciola hepatica* against flukicidal action of the amine of diamphenethide in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1981**, *2* (5–6), 339–48.

(157) Edwards, S. R.; Campbell, A. J.; Sheers, M.; Moore, R. J.; Montague, P. E. Studies of the effect of diamphenethide and oxytetracycline on the metabolism of *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1981**, *2* (5–6), 323–38.

(158) Schulman, M. D.; Ostlind, D. A.; Valentino, D. Mechanism of action of MK-401 against *Fasciola hepatica*: inhibition of phosphoglycerate kinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1982**, *5* (3), 133–45.

(159) Maizels, R. M.; Denham, D. A. Diethylcarbamazine (DEC): immunopharmacological interactions of an anti-filarial drug. *Parasitology* **1992**, *105* (Suppl), S49–60.

(160) Li, J.; Lei, B.; Liu, H.; Li, S.; Yao, X.; Liu, M.; Gramatica, P. QSAR study of malonyl-CoA decarboxylase inhibitors using GA-MLR and a new strategy of consensus modeling. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29* (16), 2636–47.

#### ■ NOTE ADDED AFTER ASAP PUBLICATION

There were errors in the abstract and at the end of the introduction in the version published February 24, 2011. Human parasite was changed to bird parasite in both places. The correct version reposted April 1, 2011.



### 3D MI-DRAGON: new model for reconstruction of US FDA drug-target network and theoretic-experimental studies of rasagiline derivatives inhibitors for AChE.

Francisco Prado-Prado<sup>1\*</sup>, Xerardo García-Mera<sup>1</sup>, Manuel Escobar<sup>1</sup>, Nerea Alonso<sup>1</sup>, Olga Caamaño<sup>1</sup>, Matilde Yañez<sup>2</sup>, and Humberto González-Díaz<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela (USC), 15782, Spain.*

<sup>2</sup> *Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, USC, 15782, Spain*

<sup>3</sup> *Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, USC, 15782, Spain*

**Abstract.** The Neurodegenerative diseases have been increasing in the last years. Many of the drugs candidates to be used in the treatment of neurodegenerative disease present specific 3D structural features. One important protein in this sense is the acetylcholinesterase (AChE); which is the target of many Alzheimer's dementia drugs. Consequently, the prediction of Drug-Proteins Interactions (DPIs/nDPIs) between new drugs candidates with specific 3D structure and targets it is of the major importance. For it, we can use Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) models to carry out rational DPIs prediction. Unfortunately, many previous QSAR models developed to predict DPIs take into consideration only 2D structural information and codify the activity against only one target. To solve this problem we can develop one 3D multi-target QSAR (3D mt-QSAR) models. In this communication, we introduce the technique 3D MI-DRAGON a new predictor for DPIs based two different well-known software. We use the software MARCH-INSIDE (MI) and DRAGON to calculate 3D structural parameters for drugs and targets respectively. Both classes of 3D parameters were used as input to train Artificial Neuronal Network (ANN) algorithms using as benchmark dataset the complex network (CN) formed by all DPIs between US FDA approved drugs and their targets. The entire dataset was downloaded from Drug Bank. The best 3D mt-QSAR predictor found is one ANN of type Multi-Layer Perceptron (MLP) with profile MLP 37:37-24-1:1. This MLP classifies correctly 274 out of 321 DPIs (Sensitivity = 85.35%) and 1041 out of 1190 nDPIs (Specificity = 87.48%), corresponding to training Accuracy = 87.03%. We validated the model with external predicting series with Sensitivity = 84.16% (542/644 DPIs; Specificity = 87.51% (2039/2330 nDPIs) and Accuracy = 86.78%. The new CNs of DPIs reconstructed from US FDA can be used to explore large DPIs databases in order to discover both new drugs and/or targets. We carried out theoretic-experimental studies to illustrate the practical use of 3D MI-DRAGON. First, we reported the prediction and pharmacological assay of 22 different rasagiline derivatives with possible AChE inhibitory activity.

**Keywords:** Drug-Protein interaction complex networks; Protein Structure Networks; multi-target QSAR; Markov Model; AChE inhibitors

**Corresponding authors:** PRADO PRADO, F. ([francisco.prado@usc.es](mailto:francisco.prado@usc.es)), Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela 15782, Spain., Fax: +34-981 594912.



## 1. Introduction

Yildirim, *et al.* [1] have built a complex network (CN) of Drug-Protein Pairs (DPIs) with the form of a bipartite graph composed of all DPIs for all US Food and Drug Administration (US FDA) approved drugs and proteins linked by drug-target binary associations. The resulting CN connects most drugs into a highly interlinked giant component, with strong local clustering of drugs of similar types according to Anatomical Therapeutic Chemical classification. It was motivated due to the strong incentive to develop new methods able of predicting potential drug-target interactions complex networks (CNs) formed by DPIs [2]. For it, we can use Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) models [5] to carry DPIs prediction. To solve this problem we can develop a 3D multi-target QSAR (3D mt-QSAR) models to predict DPIs [6]. One way to develop this class mt-QSAR is incorporating into the QSAR equation parameters of the structure of the target (protein, DNA, RNA, etc.) in addition to the structural parameters of the drug present in classic QSAR. Some of the more known software we can use to reach this goal are: DRAGON, CODESSA[7], MODES-LAB[8], TOMO-COMD[9], and MARCH-INSIDE (MI)[10]. The software DRAGON is one of the more complete calculating more than 1600 descriptors for drug structure including as zero- (0D) one- (1D), two- (2D), three-dimensional (3D) parameters.

Unfortunately several QSAR models are able to predict the activity of drugs against only one target and/or are unable to codify important 3D structural features. Speck-Planche, *et al.*[3, 4] have developed mt-QSAR for the design of multi-target inhibitors against chemokine receptors. This approach was focused on the construction of a mt-QSAR model for the classification and prediction of inhibitors chemokine receptors. For instance, very recently we have developed in a previous work a QSAR model base on the MARCH-INSIDE method to predict a large network of DTPs [11]. This model was based on 2D structural parameters for drugs and 1D structural parameters for protein. After that we developed MIND-BEST [12] and NL MIND-BEST [13]. Both predictors are based on 3D structural parameters of proteins calculated with software MI but they used only 2D structural parameters of drugs (calculated also with MI). The accuracy of the MIND-BEST model found was 86.32% and NL MIND-BEST was Accuracy = 90.41%. However both models only use 2D parameters using MI software. After that, to improve and obtain better results we use the software MARCH-INSIDE (MI) to calculate 3D structural parameters for targets and the software DRAGON was used to calculate 2D molecular descriptors all drugs[14]. We introduce the technique 2D MI-DRAGON a new predictor for DPIs based on two different well-known software.

As was mentioned in the previous paragraph we can seek a QSAR predictor for DPIs using molecular descriptors of both drug and target. In this work, we introduce for first time 3D MI-DRAGON a new predictor for DPIs based on two different well-known software. We use the software MARCH-INSIDE (MI) to calculate 3D structural parameters for targets and the software DRAGON for 3D parameters of all DPIs present in the Drug Bank (US FDA benchmark dataset) [15-18]. Both classes of parameters were used as input of different Artificial Neuronal Network (ANN) algorithms to seek an accurate non-linear mt-QSAR predictor. 3D MI-DRAGON offers a good opportunity for fast-track calculation of all possible DPIs of one drug enabling us to re-construct large drug-target or DPIs Complex Networks (CNs). In this study, we reported the prediction and pharmacological assay of 22 different rasagiline derivatives with AChE inhibitory activity. The present work reports the

attempts to calculate within unified DPIs. All this can help to design new inhibitors of AChE. A very good 3D MI-DRAGON QSAR model was obtained, and the subsequent combined QSAR & CN analysis may become of major importance for the prediction of the activity of new compounds against different targets or the discovery of new targets. In this sense we reported an illustrative study that combines both experiment and theory to show how to use this model in practical situations. We reported the prediction and pharmacological assay of rasagiline derivatives with AChE inhibitory activity. In **Figure 1** we depict a flowchart with the main steps given in this work to train and validate the ANN classifier.

**Figure 1 comes about here**

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Computational methods**

#### **2.1.1 MOPAC AM1 Optimization geometry method using CS CHEM 3D.**

Molecular structures of all FDA drugs were generated with CHEM 3D Ultra (version 2005). The energy of each intermediate was then minimized using the semi-empirical MOPAC method with a minimum RMS gradient of 0.100, which specifies the convergence criteria for the gradient of the potential energy surface. The geometry of the molecules was optimized and the values of the quantum chemical descriptors of each compound were calculated using AM1. AM1 theory was used with a closed shell function. The MOPAC AM1 method was selected because it was a semi-empirical quantum chemical method and the computational time was much shorter than that needed by ab initio method.

#### **2.1.2. MI-DRAGON technique**

**3D Parameters for drugs.** The DRAGON software 4.0 [19] was utilized here to calculate the 3D parameters of drugs. It depends on whether they are computed from the chemical formula, substructure list representation, molecular graph or geometrical representation of the molecule, respectively [20, 21]. In this work, we calculated only GETAWAY 3D descriptors. We use these descriptors after optimized for use with 3D descriptors.

**3D Parameters of proteins.** In previous works we have predicted protein function based on different protein structural parameters derived from a Markov matrix that account for electrostatic interactions between aminoacid pairs in the 3D structure of the protein. One of the classes of parameters used was called the Shannon Entropy  ${}^T\theta_k(R)$  of the markov matrix. These values are used here as inputs to describe information about the structure of the drug target proteins (T) in order to construct the mt-QSAR models for DTPs. The detailed explanation has been published before [22-30] and reviewed in detail more recently [31]. At follows we give the formula for  ${}^T\theta_k(R)$  values and some general explanations:

$${}^T\theta_k(R) = - \sum_{j \in R} {}^k p_j(R) \cdot \log[{}^k p_j(R)] \quad (1)$$

Where,  ${}^k p_i(R)$  values are the absolute probabilities with which the effect of the electrostatic interaction propagates from the amino acid  $i^{\text{th}}$  to other amino acids  $j^{\text{th}}$  next to it and returns to  $i^{\text{th}}$  after  $k$ -steps. These probabilities refer to: aminoacids considered isolated in the space ( $k = 0$ ), interaction between aminoacids in direct contact ( $k = 1$ ) or spatial ( $k > 1$ ) indirect interactions between amino acids placed at a distance equal to  $k$ -times the cut-off distance ( $r_{ij} = k \cdot r_{\text{cut-off}}$ ) in the residue network. Euclidean 3D space  $r_3 = (x, y, z)$  coordinates of the  $C_\alpha$  atoms of amino acids listed in protein PDB files. For calculation, all water molecules and metal ions were removed [32]. All calculations were carried out with our in-house software MARCH-INSIDE 2.0 [32]. For the calculation, the MARCH-INSIDE

software always uses the full matrix, never a sub-matrix, but the last summation term may run either for all amino acids or only for some specific protein regions (R) denoted as: *c* for core, *i* for inner, *m* for middle, and *s* for surface regions, respectively). Consequently, we can calculate different  ${}^T\theta_k(R)$  for the amino acids contained in the regions (*c*, *i*, *m*, *s*, or *t*) and placed at a topological distance *k* each other within this orbit (*k* is the order) [22, 23, 33-35]. In this work, we have calculated altogether 5(types of regions) x 6(orders considered) = 30  ${}^T\theta_k(R)$  indices for each protein.

**2.1.3 Statistical analysis.** Let be  ${}^D\theta_k(G)$  entropy descriptors molecular that codify information about drug structure and  ${}^T\theta_k(R)$  entropy descriptors that codify information about drug target proteins; we attempt to develop a simple mt-QSAR model in the form of a linear classifier with the general formula:

$$S(DTP)_{pred} = \sum_{k=0}^5 a_{G,k} \cdot {}^D\theta_k(G) + \sum_{k=0}^5 b_{R,k} \cdot {}^T\theta_k(R) + c_0 \quad (2)$$

We used Linear Discriminating Analysis (LDA) to fit this discriminant function. The model deals with the classification of a compound set with or without affinity on different receptors. A dummy variable Affinity Class (AC) was used as input to codify the affinity. This variable indicates either high (AC = 1) or low (AC = 0) affinity of the drug by the receptor.  $S(DTP)_{pred}$  or DTP affinity predicted score is the output of the model and it is a continuous dimensionless score that sorts compounds from low to high affinity to the target coinciding DTPs with higher values of  $S(DTP)_{pred}$  and nDTPs with lowest values. In equation (6), *b* represents the coefficients of the classification function, determined by the LDA module of the STATISTICA 6.0 software package [36]. We used Forward Stepwise algorithm for a variable selection. The statistical significance of the LDA model was determined calculating the p-level (p) of error with Chi-square test. We also inspected the Specificity, Sensitivity, and total Accuracy to determine the quality-of-fit to data in training. Cases for training set were selected at random out of the cases in full dataset. The remnant cases were used to validate the model. The validation of the model was corroborated with these external prediction series; these cases were never used to train the model. The ration between training/validation set was 2/1 approximately. This procedure to select training and validation sets is largely known and used to train QSAR models [37-43].

**2.1.4 ANN analysis.** The non-linear mt-QSAR model was constructed using ANN analysis. All models trained were carried out in STATISTICA 6.0 [36]. In so doing, we used a very simple type of ANN called Three Layers Perceptron (MLP-3) to fit this discriminant function. The model deals with the classification of a compound set with or without affinity on different receptors. A dummy variable Affinity Class (AC) was used as input to codify the affinity. This variable indicates either high (AC = 1) or low (AC = 0) affinity of the drug by the receptor.  $S(DTP)_{pred}$  or DTP affinity predicted score is the output of the model and it is a continuous dimensionless score that sorts compounds from low to high affinity to the target coinciding DTPs with higher values of  $S(DTP)_{pred}$  and nDTPs with lowest values. In equation (2), *b* represents the coefficients of the LNN classification function, determined by the ANN module of the STATISTICA 6.0 software package [36]. We used Forward Stepwise algorithm for a variable selection.

In addition, we can explore more complicated non-linear ANNs in order to improve the accuracy of the classifier. We processed our data with different ANNs looking for a better model. Four types of ANNs were used, namely, Probabilistic Neural Network (PNN), Radial Basic Function (RBF), Linear Neural Network (LNN), and Four Layer Perceptron



(MLP-4)[44, 45]. The quality of all the ANNs (linear or non-linear) was determined calculating values of Specificity, Sensitivity, and total Accuracy to determine the quality-of-fit to data in training. The validation of the model was corroborated with external prediction series. We also reported ROC-curve analysis (ROC curve can be used to select an optimum decision) for both training and validation series [44, 46].

**2.1.5 Data set.** The data set was formed by a set of marketed DPIs with known affinity of drugs by targets. This dataset is the same benchmark data used in previous works [1, 5, 12, 13] in this area and contains all drugs approved by the US FDA. We download this dataset from the public resource called Drug Bank [12, 13, 16-18]. The data set was formed for more than 519 drugs with their respectively 336 targets. Subsequently, we were able to collect above 4485 cases (drug-protein interactions) instead of 519 x 336 cases. In addition the data set was used to develop ANN models to performance the model. The names or codes for all compounds are depicted in **Table 1SM** of the supplementary material, due to space constraints, as well as the references consulted to compile the data in this table.

**2.1.6 Complex network construction.** We construct a DPIs network in order to achieve the drug and protein affinity with a network approach. Generally in this network, one node may represent a drug or a target. On the other hand, the edges represents the DPIs; express relationships between pairs of drugs with their targets [1]. Anyhow, the nodes representing targets may be of at least two types. In almost all cases reported up to date each target is represented only once in the network. In this class of “static” DPIs network the target is depicted by the node corresponding to the X-ray structure of itself. In this work, we build in total two complex networks. First, we constructed the DPIs networks for the observed data and second, DPIs network predicted by the model. The common steps to construct these networks are: First, using the Excel software in a column we introduce all the proteins, the drugs used quotation marks in our database. Then in another column lists all the cases. At the beginning of this column puts the total number of vertices, there are currently two columns of the name of drug and protein and their corresponding number of vertices. After, at the end of the columns are placed bows in the first column put the number of vertices for the drug and in another column corresponding to the protein. Then, the file was saved as a .txt format file. After we had renamed the .txt file as a .net file we read it with the CentiBin software [47, 48]. Finally, using CentiBin we can not only represent the network but also highlight all drugs and targets (nodes) connected by a specific edge or link (DPI). Using this software we can calculate vertex centralities to analyze the relationships between drug targets.

## **2.2. Illustrative experiments**

### **2.2.1. Synthesis of Rasagiline derivatives.**

**Synthesis.** Synthesis of compounds **1-22** has been previously reported by us [5, 12], see **Figure 2**.

**Figure 2 comes about here**

### **2.2.2 Determinations of cholinesterases activities**

The cholinesterase assay method of Ellman was used to determine the in vitro cholinesterase activity [49]. The activity was measured by increase in absorbance at 412 nm due to the yellow color produced from the reaction of acetylthiocholine iodide with the dithiobisnitrobenzoate (DTNB) ion.

Acetylcholinesterase from human erythrocytes, acetylcholinesterase recombinant expressed in HEK 293 cells and butyrylcholinesterase from human serum was obtained from Sigma.

**2.2.3 Experimental conditions and kinetics.** Enzyme activity was measured using a FLUOstar Optima microplate reader. The assay medium contained phosphate buffer, pH 8.0, 20 mM DTNB, 0.01 U/ml of enzyme and 0.75  $\mu$ M substrate (acetylthiocholine iodide or butyrylthiocholine iodide). The activity was determined by measuring the increase in absorbance at 412 nm at 1 min intervals for 10 min at 37 °C. In dose-dependent inhibition studies, the substrate was added to the assay medium containing enzyme, buffer, and DTNB with inhibitor after 10 min of incubation time. All experiments were carried out in duplicate and expressed as mean  $\pm$  SEM. The relative activity is expressed as percentage ratio of enzyme activity in the absence of inhibitor, see **Table 1**.

**Table 1 comes about here**

### 3. Results

#### 3.1. DPIs QSAR predictive models

**3.1.1 LDA model.** Common physicochemical properties like entropy have been demonstrated to be useful on protein QSAR [50, 51]. We used these properties as input of our model in addition to drug molecular descriptors. The present is the first mt-QSAR model combining DRAGON and MI to predict the probability with which occur DPIs between a drug and a protein. This type of models lie within the frontiers between classic QSAR for drugs and protein QSAR [33]. Some applications for the present model are the prediction of new drugs, new protein receptors or drug targets, and drug binding sites. Detailed information on the compounds, predicted classification, and probability of affinity on different receptors of the drugs used to seek the model appears in **Table 1SM** of the supplementary material. Based on the algorithms described in materials and methods the best linear model found was the following:

$$S(DTP)_{pred} = 11.01 \cdot d_1 - 36.37 \cdot d_2 - 12.77 \cdot d_3 - 9.34 \cdot d_4 - 52.17 \cdot d_5 + 1.62 \cdot d_6 - 1.65 \cdot d_7 - 0.11 \cdot d_8 - 0.10 \cdot d_9 + 0.25d_{10} + 2.48$$

$$N = 4485 \quad \chi^2 = 919.2988 \quad p - level < 0.001$$
(3)

**Table 2 comes about here**

The nomenclature used in the descriptors of the equation is found in **Table 2**. In this equation, N is the number of cases,  $\chi^2$  is the Chi-square and p is the level of error. This model, with 10 variables, classifies correctly 256 out of 321 DPIs (Sensitivity of 79.75%) and 1014 out of 1190 nDPIs (Specificity of 85.21%). Overall training Accuracy was 84.05%. The validation of the model was carried out by means of external predicting series. The model classifies correctly 498 out of 644 DPIs (77.33%) and 2000 out of 2330 nDPIs (85.84%) in validation series. Accuracy for validation series (predictability) was 83.99%. These results (**Table 3**) indicate that we developed an accurate model according to previous reports on the use of LDA in QSAR [52, 53].

**Table 3 comes about here**

**3.3.2 3D MI-DRAGON ANN model.** The previous model show good results with a relatively small number of parameters (10 parameters) and a linear equation. However, as result of the previous section we decided to carry out an ANN analysis to seek a better model using a non-linear method. Four types of ANNs were used, namely, Probabilistic Neural Network (PNN), Radial Basic Function (RBF), Three Layers Perceptron (MLP-3), and Four Layer Perceptron (MLP-4). See, previous works about the use of these ANNs in protein QSAR [5, 13]. The **Figure 3** depicts the networks topology for some of the ANN models tested. In general, at least one ANN of every type tested was statically significant.

However, one must note that the profiles of each network indicate that many of these are highly non-linear and complicated models.

**Figure 3 comes about here**

Models using ANN-QSAR has been demonstrated before; see, for instance, the works of Fernandez and Caballero [54, 55]. We compare different types of networks to obtain a better model. In **Table 3** we show the classification matrix of the different networks. The profiles of networks tested were RBF 1:1-1-1:1 with only one variable; LNN 227:227-1:1, which present many variables, and PNN 227:227-14797-2-2:1, which has a very high number of hidden neurons, see **Table 3**. After that, the simpler but more accurate ANN model found was an MLP (MLP 37:37-24-1:1) with training Accuracy = 87.03 %. This was selected as the best network found because it presents both high accuracy and an adequate number of variables accounting for features relevant for DPIs. This ANN presents 37 inputs variables ( $24 d_k + 13 \Theta_m$ ). This leads to 37 neurons in first or input layer (I), 24 neurons in the second layer or first hidden layer (H1) and only one neuron (DPI prediction) in the output layer (O). We depict the ROC-curve for MLP 37:37-24-1:1 to show how reliable was the network model developed, see **Figure 4**. Notably, the model presented had a ROC curve higher than 0.5. The model presented an area greater than 0.92. From now on we call the ANN MLP 37:37-24-1:1 as the 3D MI DRAGON predictor.

**Figure 4 comes about here**

**3.3.2.1 3D MI-DRAGON assembly of CNs for DPIs.** The construction of multi-protein CNs that incorporates protein affinity profile for drugs or the same CNs for DPIs is relevant to drug and target screening. And is one application for this model. In order to recall the capacity of 3D MI-DRAGON to predict new CNs of DPIs we selected the same benchmark database used in previous works [5, 13, 14]; which includes US FDA approved drugs with their targets. With these goals in mind, we constructed again and manually curated the above-mentioned CN obtaining a graph with 855 vertices or nodes (drugs and proteins) and  $m = 1016$  DPIs (edges). This CN of DPIs have  $D = 6.7$ ; average topological distances  $D_{ij}$  between all pairs of nodes. The same as before, we constructed a new CN of DPIs but connecting only pairs of nodes with DPIs predicted by 3D MI-DRAGON. In so doing, we obtained a value of  $D = 7.2$  and  $m = 1256$  DPIs. In **Figure 5** we illustrated visually both CNs (observed and predicted).

**Figure 5 comes about here**

In first instance, we compare this predicted network (3D MI-DRAGON) with 2D MI-DRAGON predicted network[14]. We compare to observe the similar or dissimilar topology (connectivity patterns structure) between them. Measuring in terms of TIs such as: number of nodes ( $n$ ), number of edges ( $m$ ), Wiener index ( $W$ ), diameter ( $D$ ), the Randic connectivity index ( $X_r$ ), topological distance (Dist), network average values for radiality ( $R$ ), node degree ( $\delta$ ), eccentricity ( $E$ ). In **Table 4**, we observe all the TIs are similar excepting  $n$ ,  $m$  and  $w$ . That means both CNs have a high similarity between them. These results are very interesting, because our 3D MI-DRAGON model present similar results to the 2D MI-DRAGON model, which results have been published successfully before.

**Table 4 comes about here**

To see how reliable and valid is our model. Not only compared to TIs to observe similarity between both predicted networks, but we study the centrality analysis of given networks too. This type of drug screening and drug target discovery is the calculation of those nodes (drugs or proteins) which are more relevant or important (central) in the graph. For it we can use numerical parameters that quantify the importance of a node in a graph which are

called node centralities  $C_t$  of type  $t$  [56]. These nodes identification using node centralities may help us to identify the more relevant drugs or proteins in analogy to similar procedures developed for PINs; networks of Protein-Protein Interactions (PPIs) [57]. In **Table 5** we show the predicted results of both node degree centrality ( $C_\delta$ ) and closeness centrality ( $C_{clo}$ ) for proteins and drugs present in the database and compare with the predicted results of 2D-MI-DRAGON model. The parameter  $C_\delta$  measures the local importance of a node by counting the number of nodes directly attached to him [57]. Conversely,  $C_{clo}$  measures the global importance of a node in a CN by taking in consideration the inverse of the sum of  $D_{ij}$  ( $C_{clo} = 1/\sum D_{ij}$ ) [58]. Consequently, the higher  $C_\delta$  the higher is the local importance of the node but the higher  $C_{clo}$  the lower is the global importance of the node. For instance, the protein 1HA2 is one important protein both locally and globally in this CNs with lower  $C_{clo} > 4$  and a  $C_\delta = 26$ . It means that this protein is both locally and globally important because it is the target of many drugs (high  $C_\delta$ ). This result is similar to obtained by 2D MI-DRAGON model. Another interesting result was simvastatin. Simvastatin is a hypolipidemic drug used to control elevated cholesterol, or hypercholesterolemia. It is a member of the statin class of pharmaceuticals. The primary use of simvastatin is for the treatment of dyslipidemia and the prevention of cardiovascular disease [59, 60]. Depending on our aims the more important nodes in pharmacological terms not necessarily have to be the more central in the graph (those with higher  $C_\delta$  and lower  $C_{clo}$ ), see **Table 5**. We show in this example, our model predicts efficiently. We found that the 3D MI-DRAGON model shows very similar results to the previous model, which has been published with excellent results. In **Table 2SM** of supplementary material we show all node degrees and closeness results.

**Table 5 comes about here**

### 3.2. Theoretic-Experimental Study using 3D MI-DRAGON predictor

Finally, we illustrated in one theoretic-experimental study the practical use of 3D MI-DRAGON. We reported the prediction, synthesis, and pharmacological assay of 20 different rasagiline derivatives with AChE inhibitory activity.

**3.2.1 3D MI-DRAGON prediction of rasagiline derivatives vs. AChE.** In this *in silico* experiment we used 3D MI-DRAGON to predict the interaction of the rasagiline derivatives with respect to AChE. For it, we downloaded the 3D structure of AChE protein with PDB ID 1EEA and calculated their structural parameters with MI. We also generated the SMILE codes for these compounds and we use MOPAC AM1 Optimization geometry method for these compounds for calculated their 3D structural parameters with DRAGON. After that, we predicted their propensity to undergo DPIs with AChE using as inputs for the 3D MI-DRAGON predictor the structural parameters of both the drugs and the protein. In **Table 6** we confront the results obtained using this model and the outcomes of the pharmacological assay. No compounds are selective inhibitors of AChE, which is why we used as control galantamine for AChE was. We consider the observed class for active compounds  $OC = 1$  if compound  $IC_{50} < 10 \mu M$  this cutoff is in the similar range than other used in previous works [61, 62]. As we can see in this table all the compounds rasagiline derivatives present some activity, But none of these compounds have inhibitory activity in the pharmacological assays. All of our compounds in the pharmacological assay ( $OC = 0$ ) were inactive. 3D MI-DRAGON predicted as inactive all compounds, excepting 3. The model classified correctly 19 of 22 compounds tested (86.36%). In this test, our model was compared with pharmacological testing of 22 compounds synthesized by us. And we can observe the effectiveness of our model with experimental data. Also, we note that the

model predicts all compounds tested as inactive, this is important because the model allows to discriminate between active and inactive compounds. However, some compounds were not tested by pharmacological assay, that compounds were predicted as inactive using 3D MI-DRAGON model. We discarded pharmaceutical assays of these compounds; because we consider our model reliable. This kind of model can be used to save efforts and money to perform the pharmacological tests. This is a good example of how reliable is the MI DRAGON 3D model.

**Table 6 comes about here**

**3.2.2 3D MI-DRAGON complex network of rasagiline derivatives vs. US FDA proteins.** An additional use of 3D MI-DRAGON was to carry out the “*in silico*” or virtual screening of the new compounds with respect to all other targets previously approved by US FDA [14, 63]. It may help to find new targets for these drugs or discard possible toxicological effects depending on the other targets predicted and/or discarded for these compounds. This type of experiment is of the major importance due to the cost in terms of animal sacrifice, time, materials and human resources of the experimental assay of all compounds against all these targets, see recent reviews by Duardo-Sanchez *et al.* [64-67]. In fact, over a decade, the US FDA has been engaged in the applied research, development, and evaluation of computational toxicology methods used to support the safety evaluation of a diverse set of regulated products. The basis for evaluating computational toxicology methods is multi-factorial, including the potential for increased efficiency, reduction in the numbers of animals used, lower costs, and the need to explore emerging technologies that support the goals of the US FDA's Critical Path Initiative (e.g. to make decision support information available early in the drug review process)[68].

In this experiment, we downloaded the 3D structure of all proteins that are targets of US FDA approved drugs. Next, we calculated the structural parameters of all these proteins with MI. We also generated the SMILE codes for these compounds and we use MOPAC AM1 Optimization geometry method for these compounds for calculated their 3D structural parameters with DRAGON. After that, we predicted their propensity to undergo DPIs with all US FDA proteins using as inputs for the 3D MI-DRAGON predictor the structural parameters of both the drugs and proteins. We predicted all proteins in FDA dataset vs. the 22 rasagiline derivatives. We found that most of 22 derivatives were predicted as non-active (low DPIs scores) against most proteins in the FDA database. Consequently, 3D MI-DRAGON predicts a high selectivity of rasagiline derivatives as AChE inhibitors. We can reach this goal because the model predicts these compounds as non-active with respect to most proteins that are targets of FDA drugs.

Using these results, we constructed a DP-CN for rasagiline derivatives and the FDA dataset (see **Figure 6**). As a result we obtained a CN with 87 nodes (FDA drugs, proteins, or rasagiline derivatives) and 166 DP (edges, DTPs). As In this network we can see that protein 1EEA (AChE) is predicted to interact with compound 3, this protein is an AChE target [69]. These results are good because they agree with the experimental results presented in this paper where the compound 3 show low AChE activity. The use of such complex networks can help us find and predict new drugs-protein interactions, and therefore find new drugs with improved biological activity and fewer side effects, especially in neural disease.

**Figure 6 comes about here**

#### 4. Conclusions

The 3D MI-DRAGON predictor based on structural parameters of drugs calculated with DRAGON and parameters of proteins calculated with MI. It is possible to seek excellent predictors for DPIs using as input structural parameters of drugs and proteins calculated with different programs and combined with ANN models. Combining **MARCH-INSIDE** and DRAGON approach and ANN is possible to seek one mt-QSAR classifier to predict with Accuracy > 85% the probability of drugs to bind more than 500 different drug target proteins approved by FDA of USA. 3D MI-DRAGON predictor is also useful to assemble CNs of DPIs. These CNs computationally assemble offer an alternative to discover new drugs or targets, and explore the selectivity of drugs. In this work, we exemplified these conclusions through the experimental-theoretical study of the AChE activity of new rasagiline derivatives.

#### 5. Acknowledgments

Prado-Prado F. thanks sponsorships for research position at the University of Santiago de Compostela from *Angeles Alvariño*, Xunta de Galicia.

## References

- [1] M.A. Yildirim, K.I. Goh, M.E. Cusick, A.L. Barabasi, M. Vidal, Drug-target network, *Nature biotechnology*, 25 (2007) 1119-1126.
- [2] Y. Yamanishi, M. Araki, A. Gutteridge, W. Honda, M. Kanehisa, Prediction of drug-target interaction networks from the integration of chemical and genomic spaces, *Bioinformatics*, 24 (2008) i232-240.
- [3] A. Speck-Planche, V.V. Kleandrova, F. Luan, M.N. Cordeiro, Chemoinformatics in Multi-Target Drug Discovery for Anti-Cancer Therapy: In Silico Design Of Potent And Versatile Anti-Brain Tumor Agents, *Anticancer Agents Med Chem*, (2011).
- [4] A. Speck-Planche, V.V. Kleandrova, In silico design of multi-target inhibitors for C-C chemokine receptors using substructural descriptors, *Mol Divers*, (2011).
- [5] F. Prado-Prado, X. Garcia-Mera, P. Abeijon, N. Alonso, O. Caamano, M. Yanez, T. Garate, M. Mezo, M. Gonzalez-Warleta, L. Muino, F.M. Ubeira, H. Gonzalez-Diaz, Using entropy of drug and protein graphs to predict FDA drug-target network: theoretic-experimental study of MAO inhibitors and hemoglobin peptides from *Fasciola hepatica*, *European journal of medicinal chemistry*, 46 (2011) 1074-1094.
- [6] F.J. Prado-Prado, F. Borges, L.G. Perez-Montoto, H. Gonzalez-Diaz, Multi-target spectral moment: QSAR for antifungal drugs vs. different fungi species, *Eur J Med Chem*, 44 (2009) 4051-4056.
- [7] A.M. Helguera, R.D. Combes, M.P. Gonzalez, M.N. Cordeiro, Applications of 2D descriptors in drug design: a DRAGON tale, *Curr Top Med Chem*, 8 (2008) 1628-1655.
- [8] E. Estrada, E. Molina, D. Nodarse, E. Uriarte, Structural contributions of substrates to their binding to P-Glycoprotein. A TOPS-MODE approach, *Curr Pharm Des*, 16 (2010) 2676-2709.
- [9] Y. Marrero-Ponce, G.M. Casanola-Martin, M.T. Khan, F. Torrens, A. Rescigno, C. Abad, Ligand-based computer-aided discovery of tyrosinase inhibitors. Applications of the TOMOCOMD-CARDD method to the elucidation of new compounds, *Curr Pharm Des*, 16 (2010) 2601-2624.
- [10] H. Gonzalez-Diaz, A. Duardo-Sanchez, F.M. Ubeira, F. Prado-Prado, L.G. Perez-Montoto, R. Concu, G. Podda, B. Shen, Review of MARCH-INSIDE & complex networks prediction of drugs: ADMET, anti-parasite activity, metabolizing enzymes and cardiotoxicity proteome biomarkers, *Curr Drug Metab*, 11 (2010) 379-406.
- [11] D. Vina, E. Uriarte, F. Orallo, H. Gonzalez-Diaz, Alignment-free prediction of a drug-target complex network based on parameters of drug connectivity and protein sequence of receptors, *Mol Pharm*, 6 (2009) 825-835.
- [12] H. Gonzalez-Diaz, F. Prado-Prado, X. Garcia-Mera, N. Alonso, P. Abeijon, O. Caamano, M. Yanez, C.R. Munteanu, A. Pazos, M.A. Dea-Ayuela, M.T. Gomez-Munoz, M.M. Garijo, J. Sansano, F.M. Ubeira, MIND-BEST: Web server for drugs and target discovery; design, synthesis, and assay of MAO-B inhibitors and theoretical-experimental study of G3PDH protein from *Trichomonas gallinae*, *Journal of proteome research*, 10 (2011) 1698-1718.
- [13] H. Gonzalez-Diaz, F. Prado-Prado, E. Sobarzo-Sanchez, M. Haddad, S. Maurel Chevalley, A. Valentin, J. Quetin-Leclercq, M.A. Dea-Ayuela, M. Teresa Gomez-Munos, C.R. Munteanu, J. Jose Torres-Labandeira, X. Garcia-Mera, R.A. Tapia, F.M. Ubeira, NL MIND-BEST: a web server for ligands and proteins discovery--theoretic-experimental study of proteins of *Giardia lamblia* and new compounds active against *Plasmodium falciparum*, *J Theor Biol*, 276 (2011) 229-249.

- [14] F. Prado-Prado, X. Garcia-Mera, M. Escobar, E. Sobarzo-Sanchez, M. Yanez, P. Riera-Fernandez, H. Gonzalez-Diaz, 2D MI-DRAGON: a new predictor for protein-ligands interactions and theoretic-experimental studies of US FDA drug-target network, oxoisoaporphine inhibitors for MAO-A and human parasite proteins, *European journal of medicinal chemistry*, 46 (2011) 5838-5851.
- [15] J. Kirchmair, P. Markt, S. Distinto, D. Schuster, G.M. Spitzer, K.R. Liedl, T. Langer, G. Wolber, The Protein Data Bank (PDB), its related services and software tools as key components for in silico guided drug discovery, *J Med Chem*, 51 (2008) 7021-7040.
- [16] C. Knox, V. Law, T. Jewison, P. Liu, S. Ly, A. Frolkis, A. Pon, K. Banco, C. Mak, V. Neveu, Y. Djoumbou, R. Eisner, A.C. Guo, D.S. Wishart, DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs, *Nucleic Acids Res*, 39 (2011) D1035-1041.
- [17] D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, D. Cheng, S. Shrivastava, D. Tzur, B. Gautam, M. Hassanali, DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets, *Nucleic Acids Res*, 36 (2008) D901-906.
- [18] D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, S. Shrivastava, M. Hassanali, P. Stothard, Z. Chang, J. Woolsey, DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration, *Nucleic Acids Res*, 34 (2006) D668-672.
- [19] Talete srl, DRAGON for Windows (Software for Molecular Descriptor Calculations), in, 2005.
- [20] R. Todeschini, V. Consonni, *Handbook of Molecular Descriptors*., 2000.
- [21] E. Papa, F. Villa, P. Gramatica, Statistically validated QSARs, based on theoretical descriptors, for modeling aquatic toxicity of organic chemicals in *Pimephales promelas* (fathead minnow), *J Chem Inf Model*, 45 (2005) 1256-1266.
- [22] H. González-Díaz, Y. Pérez-Castillo, G. Podda, E. Uriarte, Computational Chemistry Comparison of Stable/Nonstable Protein Mutants Classification Models Based on 3D and Topological Indices, *Journal of Computational Chemistry*, 28 (2007) 1990-1995.
- [23] H. Gonzalez-Diaz, L. Saiz-Urra, R. Molina, Y. Gonzalez-Diaz, A. Sanchez-Gonzalez, Computational chemistry approach to protein kinase recognition using 3D stochastic van der Waals spectral moments, *J. Comput. Chem.*, 28 (2007) 1042-1048.
- [24] G. Agüero-Chapin, A. Antunes, F.M. Ubeira, K.C. Chou, H. Gonzalez-Diaz, Comparative Study of Topological Indices of Macro/Supramolecular RNA Complex Networks, *Journal of chemical information and modeling*, 48 (2008) 2265–2277.
- [25] M. Cruz-Montegudo, C.R. Munteanu, F. Borges, M.N.D.S. Cordeiro, E. Uriarte, K.-C. Chou, H. González-Díaz, Stochastic molecular descriptors for polymers. 4. Study of complex mixtures with topological indices of mass spectra spiral and star networks: The blood proteome case, *Polymer*, 49 (2008) 5575-5587.
- [26] M.A. Dea-Ayuela, Y. Perez-Castillo, A. Meneses-Marcel, F.M. Ubeira, F. Bolas-Fernandez, K.C. Chou, H. Gonzalez-Diaz, HP-Lattice QSAR for dynein proteins: experimental proteomics (2D-electrophoresis, mass spectrometry) and theoretic study of a *Leishmania infantum* sequence, *Bioorg. Med. Chem.*, 16 (2008) 7770-7776.
- [27] G. Agüero-Chapin, H. Gonzalez-Diaz, G. de la Riva, E. Rodriguez, A. Sanchez-Rodriguez, G. Podda, R.I. Vazquez-Padron, MMM-QSAR recognition of ribonucleases without alignment: comparison with an HMM model and isolation from *Schizosaccharomyces pombe*, prediction, and experimental assay of a new sequence, *Journal of chemical information and modeling*, 48 (2008) 434-448.
- [28] G. Ferino, H. Gonzalez-Diaz, G. Delogu, G. Podda, E. Uriarte, Using spectral moments of spiral networks based on PSA/mass spectra outcomes to derive quantitative



proteome-disease relationships (QPDRs) and predicting prostate cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 372 (2008) 320-325.

[29] H. Gonzalez-Diaz, M.A. Dea-Ayuela, L.G. Perez-Montoto, F.J. Prado-Prado, G. Agüero-Chapin, F. Bolas-Fernandez, R.I. Vazquez-Padron, F.M. Ubeira, QSAR for RNases and theoretic-experimental study of molecular diversity on peptide mass fingerprints of a new *Leishmania infantum* protein, *Mol. Divers.*, (2009).

[30] G. Agüero-Chapin, J. Varona-Santos, G.A. de la Riva, A. Antunes, T. Gonzalez-Villa, E. Uriarte, H. Gonzalez-Diaz, Alignment-Free Prediction of Polygalacturonases with Pseudofolding Topological Indices: Experimental Isolation from *Coffea arabica* and Prediction of a New Sequence, *Journal of proteome research*, 8 (2009) 2122-2128.

[31] H. Gonzalez-Diaz, F. Prado-Prado, F.M. Ubeira, Predicting antimicrobial drugs and targets with the MARCH-INSIDE approach, *Curr Top Med Chem*, 8 (2008) 1676-1690.

[32] H. González-Díaz, Y. González-Díaz, L. Santana, F.M. Ubeira, E. Uriarte, Proteomics, networks and connectivity indices, *Proteomics*, 8 (2008) 750-778.

[33] H. Gonzalez-Diaz, L. Saiz-Urra, R. Molina, L. Santana, E. Uriarte, A model for the recognition of protein kinases based on the entropy of 3D van der Waals interactions, *Journal of proteome research*, 6 (2007) 904-908.

[34] H. Gonzalez-Diaz, R. Molina, E. Uriarte, Recognition of stable protein mutants with 3D stochastic average electrostatic potentials, *FEBS Lett.*, 579 (2005) 4297-4301.

[35] R. Concu, G. Podda, E. Uriarte, H. Gonzalez-Diaz, Computational chemistry study of 3D-structure-function relationships for enzymes based on Markov models for protein electrostatic, HINT, and van der Waals potentials, *J. Comput. Chem.*, 30 (2009) 1510-1520.

[36] StatSoft.Inc., STATISTICA (data analysis software system), version 6.0, [www.statsoft.com.Statsoft](http://www.statsoft.com.Statsoft), Inc., in, 2002.

[37] G.M. Casanola-Martin, Y. Marrero-Ponce, M.T. Khan, S.B. Khan, F. Torrens, F. Perez-Jimenez, A. Rescigno, C. Abad, Bond-based 2D quadratic fingerprints in QSAR studies: virtual and in vitro tyrosinase inhibitory activity elucidation, *Chem Biol Drug Des*, 76 (2010) 538-545.

[38] J.A. Castillo-Garit, M.C. Vega, M. Rolon, Y. Marrero-Ponce, V.V. Kouznetsov, D.F. Torres, A. Gomez-Barrio, A.A. Bello, A. Montero, F. Torrens, F. Perez-Gimenez, Computational discovery of novel trypanosomicidal drug-like chemicals by using bond-based non-stochastic and stochastic quadratic maps and linear discriminant analysis, *Eur J Pharm Sci*, 39 (2010) 30-36.

[39] R. Gozalbes, F. Barbosa, E. Nicolai, D. Horvath, N. Froloff, Development and validation of a pharmacophore-based QSAR model for the prediction of CNS activity, *ChemMedChem*, 4 (2009) 204-209.

[40] Y. Marrero-Ponce, A. Meneses-Marcel, O.M. Rivera-Borroto, R. Garcia-Domenech, J.V. De Julian-Ortiz, A. Montero, J.A. Escario, A.G. Barrio, D.M. Pereira, J.J. Nogal, R. Grau, F. Torrens, C. Vogel, V.J. Aran, Bond-based linear indices in QSAR: computational discovery of novel anti-trichomonal compounds, *J Comput Aided Mol Des*, 22 (2008) 523-540.

[41] S.J. Patankar, P.C. Jurs, Classification of inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B using molecular structure based descriptors, *J Chem Inf Comput Sci*, 43 (2003) 885-899.

[42] M. Murcia-Soler, F. Perez-Gimenez, F.J. Garcia-March, M.T. Salabert-Salvador, W. Diaz-Villanueva, P. Medina-Casamayor, Discrimination and selection of new potential antibacterial compounds using simple topological descriptors, *J Mol Graph Model*, 21 (2003) 375-390.

- [43] R.A. Cercos-del-Pozo, F. Perez-Gimenez, M.T. Salabert-Salvador, F.J. Garcia-March, Discrimination and molecular design of new theoretical hypolipemic agents using the molecular connectivity functions, *J Chem Inf Comput Sci*, 40 (2000) 178-184.
- [44] F.J. Prado-Prado, X. Garcia-Mera, H. Gonzalez-Diaz, Multi-target spectral moment QSAR versus ANN for antiparasitic drugs against different parasite species, *Bioorg. Med. Chem.*, 18 (2010) 2225-2231.
- [45] Y. Rodriguez-Soca, C.R. Munteanu, J. Dorado, A. Pazos, F.J. Prado-Prado, H. Gonzalez-Diaz, Trypano-PPI: a web server for prediction of unique targets in trypanosome proteome by using electrostatic parameters of protein-protein interactions, *Journal of proteome research*, 9 (2010) 1182-1190.
- [46] F.J. Prado-Prado, H. Gonzalez-Diaz, L. Santana, E. Uriarte, Unified QSAR approach to antimicrobials. Part 2: predicting activity against more than 90 different species in order to halt antibacterial resistance, *Bioorg. Med. Chem.*, 15 (2007) 897-902.
- [47] B.H. Junker, D. Koschutzki, F. Schreiber, Exploration of biological network centralities with CentiBiN, *BMC Bioinformatics*, 7 (2006) 219.
- [48] D. Koschützki, CentiBiN Version 1.4.2, in, 2006, pp. CentiBiN Version 1.4.2, Centralities in Biological Networks © 2004-2006 Dirk Koschützki Research Group Network Analysis, IPK Gatersleben, Germany.
- [49] E. GL, C. KD, A.V. Jr, F.-S. RM, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemistry Pharmacology*, 7 (1961) 88-95.
- [50] O. Ivanciuc, N. Oezguen, V.S. Mathura, C.H. Schein, Y. Xu, W. Braun, Using property based sequence motifs and 3D modeling to determine structure and functional regions of proteins, *Current medicinal chemistry*, 11 (2004) 583-593.
- [51] C.H. Schein, O. Ivanciuc, W. Braun, Common physical-chemical properties correlate with similar structure of the IgE epitopes of peanut allergens, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (2005) 8752-8759.
- [52] Y.M. Alvarez-Ginarte, Y. Marrero-Ponce, J.A. Ruiz-Garcia, L.A. Montero-Cabrera, J.M. Vega, P. Noheda Marin, R. Crespo-Otero, F.T. Zaragoza, R. Garcia-Domenech, Applying pattern recognition methods plus quantum and physico-chemical molecular descriptors to analyze the anabolic activity of structurally diverse steroids, *Journal of Computational Chemistry*, (2007).
- [53] A.H. Morales, J.E. Rodríguez-Borges, X. García-Mera, F. Fernández, M.N. Dias-Sueiro-Cordeiro, Probing the Anticancer Activity of Nucleoside Analogues: A QSAR Model Approach Using an Internally Consistent Training Set, *Journal of Medicinal Chemistry*, 50 (2007) 1537-1545.
- [54] M. Fernandez, J. Caballero, A. Tundidor-Camba, Linear and nonlinear QSAR study of N-hydroxy-2-[(phenylsulfonyl)amino]acetamide derivatives as matrix metalloproteinase inhibitors, *Bioorg Med Chem*, 14 (2006) 4137-4150.
- [55] J. Caballero, M. Fernandez, Linear and nonlinear modeling of antifungal activity of some heterocyclic ring derivatives using multiple linear regression and Bayesian-regularized neural networks, *J Mol Model*, 12 (2006) 168-181.
- [56] H. Gonzalez-Diaz, Y. Gonzalez-Diaz, L. Santana, F.M. Ubeira, E. Uriarte, Proteomics, networks and connectivity indices, *Proteomics*, 8 (2008) 750-778.
- [57] H. Jeong, S.P. Mason, A.L. Barabasi, Z.N. Oltvai, Lethality and centrality in protein networks, *Nature*, 411 (2001) 41-42.
- [58] E. Estrada, Virtual identification of essential proteins within the protein interaction network of yeast, *Proteomics*, 6 (2006) 35-40.

- [59] P.A. Todd, K.L. Goa, Simvastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia, *Drugs*, 40 (1990) 583-607.
- [60] O. Hernandez-Perera, D. Perez-Sala, J. Navarro-Antolin, R. Sanchez-Pascuala, G. Hernandez, C. Diaz, S. Lamas, Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells, *J Clin Invest*, 101 (1998) 2711-2719.
- [61] L. Santana, E. Uriarte, H. González-Díaz, G. Zagotto, R. Soto-Otero, E. Mendez-Alvarez, A QSAR model for in silico screening of MAO-A inhibitors. Prediction, synthesis, and biological assay of novel coumarins, *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (2006) 1149-1156.
- [62] L. Santana, H. Gonzalez-Diaz, E. Quezada, E. Uriarte, M. Yanez, D. Vina, F. Orallo, Quantitative structure-activity relationship and complex network approach to monoamine oxidase a and B inhibitors, *J. Med. Chem.*, 51 (2008) 6740-6751.
- [63] N.T. Nguyen, D.M. Cook, L.A. Bero, The decision-making process of US Food and Drug Administration advisory committees on switches from prescription to over-the-counter status: a comparative case study, *Clin Ther*, 28 (2006) 1231-1243.
- [64] A. Duardo-Sanchez, G. Patlewicz, A. Lopez-Diaz, Current topics on software use in medicinal chemistry: intellectual property, taxes, and regulatory issues, *Curr Top Med Chem*, 8 (2008) 1666-1675.
- [65] H. González-Díaz, F. Prado-Prado, L.G. Pérez-Montoto, A. Duardo-Sánchez, A. López-Díaz, QSAR Models for Proteins of Parasitic Organisms, Plants and Human Guests: Theory, Applications, Legal Protection, Taxes, and Regulatory Issues, *Curr Proteomics*, 6 (2009) 214-227.
- [66] H. González-Díaz, A. Duardo-Sanchez, F.M. Ubeira, F. Prado-Prado, L.G. Pérez-Montoto, R. Concu, G. Podda, B. Shen, Review of MARCH-INSIDE & Complex Networks prediction of Drugs: ADMET, Anti-parasite Activity, Metabolizing Enzymes and Cardiotoxicity Proteome Biomarkers Current Drug Metabolism, 11 (2010) 379-406.
- [67] H. Gonzalez-Diaz, F. Romaris, A. Duardo-Sanchez, L.G. Perez-Montoto, F. Prado-Prado, G. Patlewicz, F.M. Ubeira, Predicting drugs and proteins in parasite infections with topological indices of complex networks: theoretical backgrounds, applications, and legal issues, *Curr Pharm Des*, 16 (2010) 2737-2764.
- [68] C. Yang, L.G. Valerio, Jr., K.B. Arvidson, Computational toxicology approaches at the US Food and Drug Administration, *Altern Lab Anim*, 37 (2009) 523-531.
- [69] M.L. Raves, M. Harel, Y.P. Pang, I. Silman, A.P. Kozikowski, J.L. Sussman, Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A, *Nat Struct Biol*, 4 (1997) 57-63.

**Figure Legends:**

**Figure 1.** Flowchart of all steps given in this work to develop the new model

**Figure 2.** Rasagiline derivatives used in this work

**Figure 3.** Generic Topology of ANN models trained in this work

**Figure 4.** ROC Curve for 3D MI-DRAGONAGON predictor (red = train series, blue = validation series)

**Figure 5.** Observed vs. Predicted drug-target complex networks

**Figure 6.** Complex network of rasagiline derivatives vs. US FDA proteins

**Tables:**

**Table 1.** Inhibitory activity of different rasagiline derivatives .

Compounds	hAChE (IC <sub>50</sub> $\mu$ M)		hAChE (IC <sub>50</sub> $\mu$ M)
1	>100 $\mu$ M	12	>100 $\mu$ M
2	>100 $\mu$ M	13	No tested
3	>100 $\mu$ M	14	No tested
4	No tested	15	No tested
5	**	16	No tested
6	No tested	17	**
7	**	18	**
8	No tested	19	**
9	**	20	**
10	>100 $\mu$ M	21	**
11	>100 $\mu$ M	22	**
Galantamine	1.43 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>		
Eserine	151.40 $\pm$ 5.63 nM		
Tacrine	130,90 $\pm$ 6,83 nM		

Each IC<sub>50</sub> value is the mean  $\pm$  S.E.M. from five experiments.

**Table 2.** Detailed list of the symbols and description for all parameters present in the model.

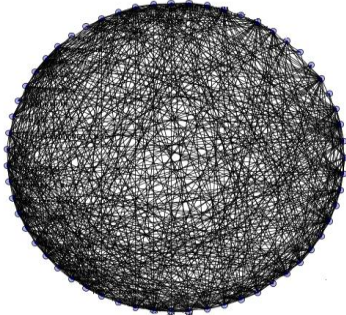
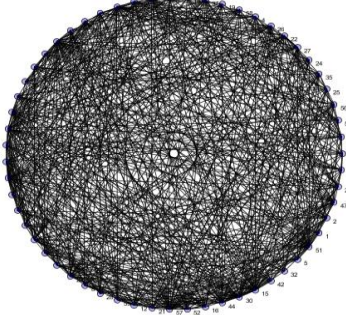
Original Descriptor	Descriptor name	Code ID
H7v	H autocorrelation of lag 7 / weighted by atomic van der Waals volumes	d <sub>1</sub>
HATS5v	leverage-weighted autocorrelation of lag 5 / weighted by atomic van der Waals volumes	d <sub>2</sub>
HATS4e	leverage-weighted autocorrelation of lag 4 / weighted by atomic Sanderson electronegativities	d <sub>3</sub>
HATS6e	leverage-weighted autocorrelation of lag 6 / weighted by atomic Sanderson electronegativities	d <sub>4</sub>
R5e+	R maximal autocorrelation of lag 5 / weighted by atomic Sanderson electronegativities	d <sub>5</sub>
${}^t\theta_4(\text{core})$	Entropy of all aminoacids placed in the core region and all the neighbors at distance $k \leq 4$	d <sub>6</sub>
${}^t\theta_5(\text{core})$	Entropy of all aminoacids placed in the core region and all the neighbors at distance $k \leq 5$	d <sub>7</sub>
${}^t\theta_5(\text{inner})$	Entropy of all aminoacids placed in the inner region and all the neighbors at distance $k \leq 5$	d <sub>8</sub>
${}^t\theta_2(\text{middle})$	Entropy of all aminoacids placed in the middle region and all the neighbors at distance $k \leq 2$	p <sub>1</sub>
${}^t\theta_0(\text{surface})$	Entropy of all aminoacids placed in the surface region and all the neighbors at distance $k \leq 0$	d <sub>9</sub>

**Table 3.** Comparison of LDA and different ANNs classification models.

Model profile	Class	Train			Stat.	Validation		
		%	DPIs	nDPIs	Par.	%	DPIs	nDPIs
MI DRAGON 3D <b>MLP</b> <b>37:37-24-1:1</b>	DPIs	85.36	274	47	Sn	84.16	542	102
	nDPIs	87.48	149	1041	Sp	87.51	291	2039
	Total	87.03			Ac	86.79		
LDA <sup>a</sup> 10:10-1:1	DPIs	79.75	256	65	Sn	77.33	498	146
	nDPIs	85.21	176	1014	Sp	85.84	330	2000
	Total	84.05			Ac	83.99		
PNN 227:227-14797-2-2:1	DPIs	0	0	644	Sn	0	0	321
	nDPIs	100	0	2346	Sp	100	0	1174
	Total	78.46			Ac	78.53		
RBF 1:1-1-1:1	DPIs	47.05	303	341	Sn	52.65	169	152
	nDPIs	56.01	1032	1314	Sp	54.86	530	644
	Total	54.08			Ac	54.38		
LNN 227:227-1:1	DPIs	53.73	346	298	Sn	45.79	147	174
	nDPIs	32.05	1594	752	Sp	31.52	804	370
	Total	36.72			Ac	34.58		

DPIs: Drug-Target Pairs for compounds with high affinity; nDPIs: Drug-Target Pair for compounds with non-affinity; Stat. is statistics, Par. is parameter

**Table 4** Comparison 3D MI-DRAGON versus 2D MI-DRAGON.

2D MI-DRAGON	Value	TIs	Value	3D MI-DRAGON
	706	n	59	
	907	m	631	
	1826812	W	2057954	
	18	D	19	
	255.09	Xr	266.39	
	2.49	$\delta$	2.44	
	6.7	Dist	7.2	
	0.078	E	0.083	
	12.43	R	11.39	

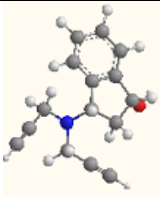
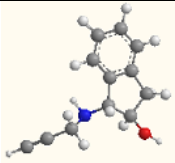
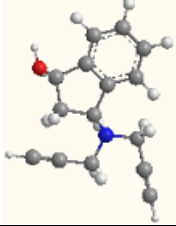
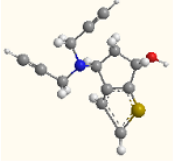
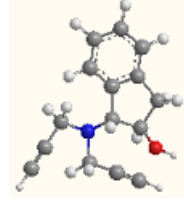
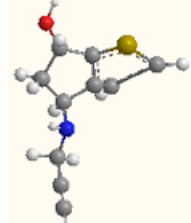
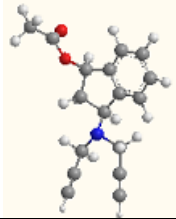
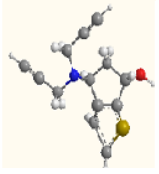
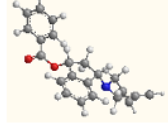
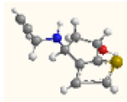
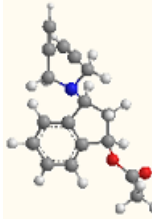
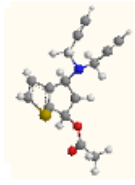
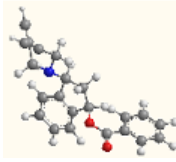
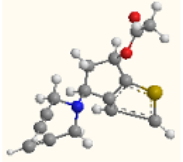
<sup>a</sup>The TIs used are: number of nodes (n), number of edges (m), Wiener index (W), diameter (D), the Randic connectivity index (Xr), topological distance (Dist), network average values for radiality (R), node degree ( $\delta$ ), eccentricity (E).

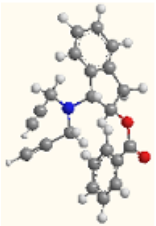
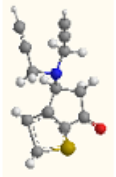
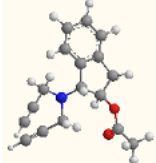
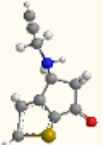
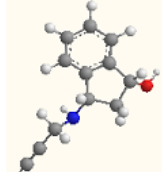
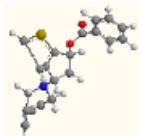
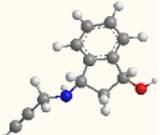
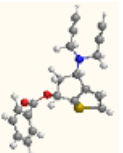
**Table 5.** Results of node degree ( $C_\delta$ ) and closeness centrality ( $C_{clo}$ ) for 20 proteins and drugs.



Drug/PDB	$C_{\delta}$ 2D-MI-DRAGON	$C_{\delta}$ 3D MI-DRAGON	Drug/PDB	$C_{clo}$ 2D-MI-DRAGON	$C_{clo}$ 3D MI-DRAGON
1HA2	44	26	1HA2	4.80	3.54
1BNA	36	40	Simvastatin	4.22	4.11
NADH	35	33	Gliclazide	4.17	3.48
1R5K	27	29	Saquinavir	4.16	3.46
Simvastatin	18	17	1BNA	4.15	3.46
1EMI	16	21	Cefalotin	4.13	2.98
1CZM	14	17	Atorvastatin	4.09	3.44
1NHZ	14	14	1A8M	4.09	3.75
1MO8	14	14	1XF0	4.07	3.09
1UZF	13	13	Estrone	4.06	2.61
1SQN	13	13	Ketoprofen	4.02	2.86
1T9N	13	12	Testosterone	4.02	2.42
1BYW	11	15	1TZI	4.02	3.77
1VRU	11	10	1KED	4.00	3.16
1E3G	11	10	Captopril	3.99	3.49
Atorvastatin	11	10	Liothyronine	3.97	3.21
1ZNC	10	11	Diflunisal	3.96	3.20
1ODW	10	10	Halothane	3.95	3.11
Pyridoxal Phosphate	9	9	Digitoxin	3.94	3.45
1HWL	9	9	Pyridoxine	3.94	3.08

**Table 6.** Prediction of rasagiline derivatives with 3D MI-DRAGON predictor

DRUG	OC	PC	Score	Structure	DRUG	OC	PC	Score	Structure
1	0	0	0.95		12	0	0	0.63	
2	0	0	0.95		13	0	0	1.00	
3	0	0	0.86		14	0	0	0.87	
4	0	0	0.95		15	0	0	1.00	
5	0	1	0.52		16	0	0	0.87	
6	0	0	0.95		17	0	0	1.00	
7	0	1	0.52		18	0	0	1.00	

8	0	0	0.88		19	0	0	1.00	
9	0	0	0.89		20	0	0	1.00	
10	0	0	0.75		21	0	0	0.97	
11	0	1	0.27		22	0	0	0.97	

OC = Observed class; PC = Predicted class